



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIA APARECIDA FONSECA

INVESTIGAÇÃO METABOLÔMICA DA MATURAÇÃO DO MORANGO
(*FRAGARIA X ANANASSA*, CULTIVAR CAMIÑO REAL) POR RMN HR-MAS.

CURITIBA
2015

FLÁVIA APARECIDA FONSECA

INVESTIGAÇÃO METABOLÔMICA DA MATURAÇÃO DO MORANGO
(*FRAGARIA X ANANASSA*, CULTIVAR *CAMIÑO REAL*) POR RMN HR-MAS.

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Andersson Barison

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Ayub.

CURITIBA

2015

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S237i Santos, Flávia Aparecida Alves dos

Investigação metabolômica da maturação do morango (*Fragaria x Ananassa*, cultivar Camião Real) por RMN HR-MAS [recurso eletrônico] / Flávia Aparecida Alves dos Santos – Curitiba, 2015.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química.
Orientador: Andersson Barison
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Ayub

1. Morango. 2. Análise físico-química. 3. Hormônios vegetais. I. Universidade Federal do Paraná. II. Barison, Andersson. III. Ayub, Ricardo Antônio. IV. Título

CDD 664.80475

Bibliotecária: Vilma Machado CRB9/1563

TERMO DE APROVAÇÃO

**INVESTIGAÇÃO METABOLÔMICA DA MATURAÇÃO DO MORANGO
(*FRAGARIA X ANANASSA*, CULTIVAR CAMIÑO REAL)**

POR RMN *HR-MAS*

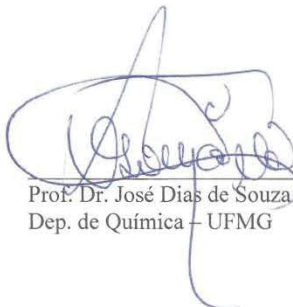
por

FLAVIA APARECIDA FONSECA


Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:

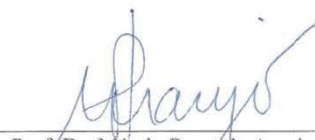



Prof. Dr. Andersson Barison
Orientador
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. José Dias de Souza Filho
Dep. de Química – UFMG



Prof. Dr. Luciano Moraes Lião
Dep. de Química – UFG

Prof. Dr. Márcio Peres de Araujo
Dep. de Química – UFPR

Profª Drª Maria Élide Alves Stefanello
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 30 de outubro de 2015.

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei, não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar, e as críticas nos fazem crescer, tanto pessoal quanto profissional!

Agradecimentos

Ao Professor Andersson Barison e Professor Ricardo Antônio Ayub pela orientação.

Aos Professores participantes das bancas de avaliação, suas discussões foram de grande valia. Aos colegas de laboratório que colaboraram na realização do trabalho. A

Professora Jaísa por todo apoio e acompanhamento do meu trabalho.

Em especial ao Alessandro que esteve ao meu lado, não me deixou desistir, sou muito grata a ele. Aos meus pais Mirna e Pedro, e filho Michael pelo apoio incondicional. A

D. Tânia pelas palavras de apoio sempre dadas. Aos meus irmãos, em especial ao Rafael pelas idas e vindas.

Ao programa de Pós-Graduação em Química.

Aos órgãos de fomento pelo auxílio financeiro.

E a Deus por permitir que todas estas pessoas passassem pela minha vida.

RESUMO

O morango se trata de um pseudo-fruto de alta taxa respiratória, e se tratando de um fruto do tipo não climatérico, é de grande importância o estudo de técnicas e tratamentos a fim de promover melhoria da qualidade durante o período de armazenamento e comércio. Neste sentido estudos sobre a ação de fitormônios têm sido realizados com objetivo de elucidar seu mecanismo de ação, tendo como ferramenta a RMN HR-MAS e análise de componentes. Este trabalho teve por objetivo investigar as alterações ocorridas no perfil químico do morango durante o desenvolvimento e maturação, e a influência de tratamentos hormonais por técnica de RMN HR-MAS e técnicas físico-químicas. Os morangos foram tratados e colhidos em plantação comercial, as amostras para RMN foram armazenadas a temperatura de -80 °C, até a obtenção dos espectros, enquanto as análises físico-químicas foram realizadas com amostras ainda frescas. Foram aplicados etileno (ETHEFON®); ácido abscísico (ABA) e 3-*epi*-brassinolídeo (BR), nos estádios de desenvolvimento e maturação verde, branco, rosa e vermelho; em três tempos de tratamento (0, 24 e 48h). Realizado análise de componentes principais nos espectros de RMN HR-MAS de ^1H . A polpa de morango foi triturada com auxílio de N_2 (L). Foram realizados testes físico-químicos de índice de acidez, pH, teores de sólidos solúveis, antocianinas, compostos fenólicos, vitamina C, açúcares e índice de firmeza. Os parâmetros de aquisição otimizados foram: sequência de pulso (ZGPR), número de promediações (1K), spinning de 5000 Hz. Através de análise espectral foi constatado a degradação principalmente de açúcares durante o período de aquisição e exposição da fruta a temperatura ambiente. Com os espectros de RMN HR-MAS de ^1H foi a possível identificação de 14 diferentes compostos: isoleucina, valina, treonina, alanina, glutamina, ácido málico, asparagina, ácido cítrico, glicose, sacarose, frutose, tirosina triptofano e ácido fumárico. As análises físico-químicas não indicaram alterações nas amostras tratadas com fitormônios, visto que seu comportamento foi semelhante as amostras tratadas com fitormônios. O mesmo observou-se na PCA, onde os agrupamentos observados (principalmente em PC3) não demonstraram tendências claras, identificando apenas compostos como ácidos orgânicos e açúcares como responsáveis por tais separações. Pode-se concluir que a aplicação dos fitormônios não causou alterações no perfil químico dos morangos observáveis através da técnica de RMN HR-MAS de ^1H e análises físico-químicas.

Palavras chave: Metabolômica. Morango. HR-MAS.

Abstract

Strawberry is a pseudofruit with a high respiratory rate, and in the case of a non-climacteric fruit of the kind, it is of great importance to study techniques and treatments to promote improvement in quality during the storage period and commerce. In this sense, studies on phytohormones action have been conducted in order to elucidate its mechanism of action, and as a tool to NMR HR-MAS and analysis components. This study aimed to investigate the changes in the chemical Strawberry profile during development and maturation, and the influence of hormonal treatments for technical HR-MAS NMR and physicochemical techniques. The strawberries were harvested and processed on a commercial planting, the NMR samples were stored at -80 °C until obtaining the spectra, while the physical-chemical analyzes were carried out with further fresh samples. ethylene were applied (ETHEFON®); abscisic acid (ABA) and 3-*epi*-brassinolide (BR) in the stages of development and maturation green, white, pink and red; three treatment times (0, 24 and 48h). Performed principal components analysis of NMR ¹H HR-MAS spectra. A strawberry pulp was triturated with N₂ aid (L). They were performed physicochemical tests acid number, pH, soluble solids, anthocyanins, phenolics, vitamin C, sugars and firmness index. The acquisition parameters were optimized: pulse sequence (ZGPR), number of stimulations (¹H), spinning 5,000 Hz. Through spectral analysis of the degradation was observed mainly sugars during the acquisition period and fruit exposure to room temperature. In the spectra of NMR ¹H HR-MAS was possible to identify 14 different compounds: isoleucine, valine, threonine, alanine, glutamine, malic acid, asparagine, citric acid, glucose, sucrose, fructose, tyrosine, tryptophan and fumaric acid. The physicochemical analyzes indicated no changes in the samples treated with plant growth regulators, since their behavior was similar samples treated with phytohormones. The same was observed in the PCA where groupings observed (mainly in PC3) did not show clear trends, identifying only compounds such as organic acids and sugars responsible for such separations. It can be concluded that the application of plant growth regulators did not cause changes in the chemical profile of strawberries observable by NMR ¹H HR-MAS technique and physico-chemical analysis.

Keywords: Metabolomics. Strawberry. HR-MAS.

LISTA DE FIGURA

Figura 1: Taxa respiratória de frutos climatéricos e não climatéricos.....	21
Figura 2: Gráfico de taxa de respiração.....	22
Figura 3: Esquema de degradação da clorofila <i>a</i>	23
Figura 4: Esquema de biossíntese de compostos fenólicos.....	25
Figura 5: Estrutura geral dos flavonóides.....	26
Figura 6: Estrutura básica das antocianinas (cátion flavílico).....	27
Figura 7: Estrutura química da cadeia de pectina.....	28
Figura 8: Diagrama esquemático indicando os estádios de desenvolvimento fruto.....	29
Figura 9: Imagem dos períodos fenológicos do morango, 1) verde; 2) branco; 3) morango rosa e 4) morango vermelho.	30
Figura 10: Estrutura química dos fitormônios.....	32
Figura 11: Representação esquemática do rotor girando no ângulo mágico (54,74°)...	39
Figura 12: Representação esquemática do rotor utilizado na técnica de HR-MAS.	39
Figura 13: Representação esquemática dos gráficos de <i>scores</i> e <i>loadings</i>	44
Figura 14: Representação esquemática do agrupamento em <i>buckets</i> de um espectro de RMN HR-MAS de ¹ H de amostra de morango.	45
Figura 15: Esquema de tratamento e amostragem do morango.	49
Figura 16: Comparação entre espectros de RMN HR-MAS de ¹ H adquiridos com e sem saturação do sinal da água.	55
Figura 17: Espectros de RMN HR-MAS de ¹ H obtidos com a sequência NOESYPR1D com diferentes combinações de tempo de recuperação e mistura.....	56
Figura 18: Sobreposição das ampliações dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H obtidos com as sequências ZGPR e NOESYPR1D.....	58
Figura 19: Espectros de RMN HR-MAS de ¹ H adquiridos antes e após o problema de saturação do sinal.....	58
Figura 20: Espectros de RMN HR-MAS de ¹ H obtidos com a sequência de excitação esculpida.	59
Figura 21: Espectros de RMN HR-MAS de ¹ H adquiridos com as sequências de pulso otimizadas.....	60
Figura 22: Sobreposição de espectros de RMN HR-MAS de ¹ H ampliados obtidos com a sequência ZGPR otimizada.....	61
Figura 23: Espectros de RMN HR-MAS de ¹ H obtidos somente da solução tampão fosfato e da amostra com tampão.	62

Figura 24: Esquema de retirada de amostra com punch.....	63
Figura 25: Expansão dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos de amostras retiradas de diferentes partes da fruta.	63
Figura 26: Ampliações dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos no teste com <i>pool</i> de amostra com e sem adição de semente.	64
Figura 27: Sobreposição das ampliações dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos com diferentes números de promediações.....	66
Figura 28: Ilustração dos volumes dos rotores.	67
Figura 29: Comparação entre espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos com rotores de diferentes capacidades de amostra.....	67
Figura 30: Sobreposição dos sinais de α - glicose (5,23 ppm), sacarose (5,40 ppm).....	68
Figura 31: Sobreposição dos sinais do hidrogênio da sacarose em 5,40 ppm obtidos em sequência.	69
Figura 32: Comparação dos sinais dos hidrogênios em 5,40 ppm (sacarose) e 5,23 ppm (α -glicose) obtidos durante os testes de degradação à temperatura ambiente.	70
Figura 33: Sobreposição das expansões da região de ácidos orgânicos e aminoácidos.	71
Figura 34: Sobreposição dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H mostrando as bandas laterais geradas pela velocidade de giro.	72
Figura 35: Expansão dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H de duas amostras de morango com atribuições de acordo com a numeração da Tabela 3.	76
Figura 36: Expansão dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H de duas amostras de morango com atribuições de acordo com a numeração da Tabela 3.	77
Figura 37: Índice de acidez do morango tratados com etileno e amostras controle.	79
Figura 38: Índice de acidez do morango tratados com ácido abscísico e brassinolídeo.	80
Figura 39: Variação do pH das amostras de morango tratados com fitormônios e controle.	81
Figura 40: Teor de açúcares totais das amostras tratados com fitormônios e controle.	82
Figura 41: Teor de açúcares totais das amostras tratados com fitormônios e controle.	83
Figura 42: Teor de sólidos solúveis das amostras com fitormônios e controle.....	84
Figura 43: Teor de antocianinas das amostras do tratadas etileno e amostras controle.	85
Figura 44: Teor de antocianinas das amostras do tratadas ácido abscísico e brassinolídeo.	86
Figura 45: Teor de antocianinas das amostras do tratadas etileno e amostras controle.	87
Figura 46: Índice de firmeza das amostras tratadas com etileno e amostras controle...	88

Figura 47: Índice de firmeza das amostras tratadas com fitormônios e controle.	89
Figura 48: Teor de ácido ascórbico das amostras tratadas com fitormônios e controle.	90
Figura 49: Gráfico de <i>scores</i> das combinações PC1 x PC2.	92
Figura 50: Gráfico de <i>loadings</i> das combinações de PC1 x PC2.	93
Figura 51: Gráficos de <i>scores</i> e <i>loadings</i> das combinações de PC3 x PC4.	94
Figura 52: Gráficos de <i>scores</i> das combinações de PC1 x PC3.	95
Figura 53: Expansão da região de agrupamento da combinação de PC1 x PC3.	95
Figura 54: Gráficos de <i>scores</i> das combinações de PC2 x PC3.	96
Figura 55: Gráfico de <i>scores</i> dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos das amostras controle, segundo o estágio de maturação (verde, branco, rosa e vermelho).	97
Figura 56: Gráfico de <i>loadings</i> dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos das amostras controle, segundo o estágio de maturação (verde, branco, rosa e vermelho). ..	97
Figura 57: Expansão da região de agrupamento da combinação de PC1 x PC3.	98
Figura 58: Gráfico de <i>scores</i> dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos das amostras tratadas com ácido abscísico (ABA), segundo os estádios de maturação.	99
Figura 59: Gráfico de <i>loadings</i> dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos das amostras tratadas com ácido abscísico (ABA), segundo os estádios de maturação.	99
Figura 60: Gráfico de <i>scores</i> dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos das amostras tratadas com etileno (ETH), segundo o estágio de maturação.	100
Figura 61: Expansão da região de agrupamento (PC1 positivo) das amostras tratadas com etileno.	101
Figura 62: Gráfico de <i>loadings</i> dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos das amostras tratadas com etileno (ETH), segundo o estágio de maturação.	101
Figura 63: Gráfico de <i>scores</i> dos <i>buckets</i> obtidos dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos das amostras tratadas com brassinolídeo (BR), segundo o estágio de maturação.	102
Figura 64: Expansões das regiões de agrupamento das amostras tratadas com brassinolídeo.	103
Figura 65: Gráfico de <i>scores</i> e <i>loadings</i> dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos das amostras tratadas com brassinolídeo (BR), segundo o estágio de maturação (verde, branco, rosa e vermelho).	104
Figura 66: Gráfico de <i>scores</i> de amostras do grupo de controle, indicando tempos de tratamento 0h (preto); 24h (azul) e 48h (verde).	105
Figura 67: Ampliação do gráfico de <i>scores</i> das amostras controle na região de PC1 positivo.	106

Figura 68: Gráfico de <i>scores</i> de amostras do grupo tratado com etileno, indicando tempos de tratamento 24h (preto) e 48h (azul).	106
Figura 69: Ampliação do gráfico de <i>scores</i> das amostras tratadas com etileno na região de PC2.....	107
Figura 70: Ampliação do gráfico de <i>scores</i> das amostras tratadas com etileno na região de PC1 positivo.....	107
Figura 71: Gráfico de <i>scores</i> de amostras do grupo tratado com ácido abscísico, indicando tempos de tratamento 24h (preto) e 48h (azul).	108
Figura 72: Ampliação do gráfico de <i>scores</i> das amostras tratadas com ácido abscísico na região de PC1.....	109
Figura 73: Ampliação do gráfico de <i>scores</i> das amostras tratadas com ácido abscísico na região de PC1.....	109
Figura 74: Gráfico de <i>scores</i> de amostras do grupo tratado com brassinolídeo, indicando tempos de tratamento 24h (preto) e 48h (azul).	110
Figura 75: Ampliação do gráfico de <i>scores</i> das amostras tratadas com brassinolídeo na região de PC2 positivo.....	110
Figura 76: Ampliação do gráfico de <i>scores</i> das amostras tratadas com brassinolídeo na região de PC2 negativo.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos dos seis cultivares de morango.....	18
Tabela 2: Tempo de aquisição e relação sinal/ruído em relação ao aumento do número de promediações.....	65
Tabela 3: Compostos identificados das amostras de morango através de espectros de RMN HR-MAS de ^1H	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA (ABS) – Ácido abscísico

BR- Brassinolídeo (3-*epi*-brassinolídeo)

C- Amostras do grupo de controle

COSY – *Correlated Spectroscopy* (Correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$)

ETH - ETHEFON[®] (composto comercial com finalidade de produção de etileno)

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (Correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C a longa distância)

HR-MAS – *High Resolution Magic Angle Spinning* (Alta resolução com giro no ângulo mágico)

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (Correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C a ligação direta)

Hz- Hertz

J – Constante de acoplamento em Hertz

ns – número de promediações

PC - *Principal Component* (componente principal)

PCA- *Principal Component Analysis* (Análise por componentes principais)

ppm⁻ – escala dos espectros de RMN (partes por milhão)

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

TMSP – d_4 – trimetilsililpropionato de sódio tetradeuterado

δ – Deslocamento químico

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1. Morango.....	16
1.2. Maturação.....	19
1.3. Fitormônios.....	31
1.4. Metabolômica	34
1.5. RMN	36
1.5.1. Técnica de High Resolution Magic Angle Spinning (HR-MAS)	36
1.5.2. Sequências de pulsos.....	40
1.5.3. Aplicabilidade da técnica	41
1.6. Análise de Componentes Principais	42
2. Objetivos.....	47
3. Experimental.....	48
3.1 Amostras	48
3.2 RMN HR-MAS.....	50
3.3 Análise Quimiométrica	50
3.4 Análises físico-químicas.....	51
4 Resultados e Discussões.....	54
4.1 Determinação dos parâmetros de aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H	54
4.2 Preparo de amostra.....	61
4.3 Determinação do número de promediações	64
4.4 Avaliação do tamanho de rotor	66
4.5 Avaliação de estabilidade da amostra	68
4.6 Avaliação de velocidade de giro	71
4.7 Identificação de compostos do morango	72
4.8 Caracterização Físico – Química do Morango	78
4.8.1 Tratamentos Hormonais vs Controle	78
4.9 Análise Multivariada	91
5 Conclusão	112

Referências.....	113
-------------------------	------------

1. Introdução

O consumo de frutas vem crescendo nos últimos anos, consequentemente a sua produção acompanha tal tendência. Neste contexto, em 2008 o Brasil aparece como terceiro maior produtor de frutas com produção menor apenas que China e Índia, no período, produziu-se cerca de 41 milhões de toneladas, destas se destacam banana, melancia, laranja e uva. No Paraná, no ano de 2009, foram produzidos 1,5 milhões de toneladas ocupando aproximadamente 67,4 mil hectares, principalmente com cultivares de laranja, banana, tangerina e uva (Andrade, 2011).

Neste cenário, considerando-se a produção de pequenas frutas (morango, framboesa, amora-preta e mirtilo), o morango é o mais expressivo, com uma produção de aproximadamente 105.000 toneladas, com cultivo concentrado em Minas Gerais (41,4%), Rio Grande do Sul (25,6%), São Paulo (15,4%) e Paraná (4,7%) (Fachinello, 2011).

1.1. Morango

O morangueiro é pertencente à divisão Magnoliophyta (Angiospermae); classe Magnoliopsida (Dicotyledoneae); subclasse Rosidae; ordem Rosales; família Rosaceae; gênero *Fragaria* L. e espécie *Fragaria x ananassa* Duch (Vicentini, 2010) tem o consumo difundido pelo mundo devido às suas características atrativas de sabor, coloração e capacidade antioxidante de seus compostos.

O cultivo do morangueiro teve início na Europa após o século XIV, em jardins com finalidade ornamental. Entretanto, a espécie *Fragaria x ananassa* teve origem naturalmente com o híbrido (resultado do cruzamento genético entre duas espécies) de duas espécies silvestres, a *F. chiloensis*, de origem chilena e *F. virginiana* originária da América do Norte, na França possivelmente por volta de 1750 (Castro, 2002). O híbrido *Fragaria x ananassa* tem por características plantas de porte baixo, frutas de tamanho grande e alta produtividade, com hábito de crescimento rasteiro (Vicentini, 2010).

Devido aos constantes melhoramentos (sem adição de material genético), uma nova combinação do seu próprio material genético tem proporcionado plantas (cultivares) com características diferenciadas, como: coloração, porte e resistência a

doenças, melhorias na produtividade. Tais melhoramentos têm sido alvo de estudos, avaliando-se o desempenho destes cultivares em relação aos cultivares tradicionais.

O cultivar Camiño Real (objeto de estudo deste trabalho) foi desenvolvido por pesquisadores da Universidade da Califórnia (EUA), caracterizado por frutos grandes e firmes com epiderme vermelha escura; alta capacidade de produção; plantas relativamente pequenas, compactas e eretas; maior vida útil e resistência a pragas quando comparadas aos cultivares brasileiros, que são consideradas frágeis (Pineli *et al.*, 2008; Fonseca, 2010).

Com o período de colheita de setembro a abril, o morango é fruto de grande importância econômica, gerando desenvolvimento e renda em regiões agrícolas, já que seu cultivo e colheita são essencialmente manuais (Antunes, 2007).

Sua parte comestível é um pseudofruto, originário principalmente da expansão da flor base (receptáculo) ou pseudocarpo onde os verdadeiros frutos (aquênios) são unidos. A qualidade físico-química e nutricional do fruto do morangueiro é determinada geneticamente e pode sofrer influência do ambiente de cultivo em função, principalmente, da luz, temperatura, umidade relativa do ar, sistema agrícola de cultivo, adubações, tipos de solo, ponto de maturação na colheita, condições de armazenagem, transporte e embalagem (Almeida, 2012; Pineli, 2009).

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos a fim de prolongar o período de prateleira do morango, mantendo condições de qualidade sensorial e nutritiva do fruto por mais tempo.

Cardoso e colaboradores (2012) relataram um estudo com base na ação sanitizante do hipoclorito de sódio e cloreto de cálcio na tentativa de prolongar o período pós-colheita. Os morangos foram tratados por imersão em solução de hipoclorito de sódio, em três diferentes concentrações e associado com solução de cloreto de sódio, armazenados com e sem refrigeração. Eles relataram a contribuição principalmente relacionadas a perda de massa, acidez, sólidos solúveis e vitamina C. Como resultado eles obtiveram maior preservação da qualidade durante tempo de armazenamento.

A ação da imersão em gluconato de cálcio e do revestimento com quitosana sobre o período pós-colheita do morango foi estudado por Hernández-Muñoz e colaboradores (2006). Eles observaram que o tratamento com cálcio foi eficaz na diminuição de danos

a superfície e perda de firmeza, enquanto tratamento com quitosana reduziu ataque fúngico e perda de massa do fruto, retardando a senescência (a depender da concentração da quitosana em solução). Devido ao maior conteúdo de cálcio na parede celular, constituída de pectina, a mesma complexa-se com cálcio e evita a despolimerização, e consequente perda de firmeza do fruto. Eles relataram a manutenção da qualidade e o valor nutricional por um maior período de tempo, porém não obtiveram prolongamento do tempo de prateleira.

Oliveira e colaboradores (2008) conduziram estudos a fim de comparar a produção do cultivar Camiño Real em sistema de túnel. Eles relataram que a produtividade do cultivar se assemelha aos demais em termos de massa, com frutos maiores, porém em menor número. Eles concluíram que, apesar de se tratar de um cultivar relativamente novo a produtividade é semelhante à dos cultivares já estabelecidos.

Seis cultivares de morango foram caracterizados por Skupień e Oszmiański (2004). Os cultivares Senga, Duckat, Elkat, Selva, Elsanta e Kent foram caracterizados por seus parâmetros físico-químicos (Tabela 1), colorimétricos e ainda quantificação de compostos bioativos. Os autores quantificaram por HPLC compostos como, os ácidos orgânicos: cítrico, málico, succínico, *p*-cumárico e elágico, além de derivados de flavonóides como: miricetina, canferol e catequina. Desta maneira indicaram o potencial nutricional do morango, ressaltando na sua composição compostos benéficos à saúde.

Dentre os parâmetros físico-químicos determinados, os autores justificaram a variação como consequência das características de cada cultivar, em que cada um ainda foi influenciado por fatores como tipo da planta e crescimento, clima, temperatura, grau de maturação entre outros fatores ligados ao processamento e preparação.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos dos seis cultivares de morango.

	Kent	Elsanta	Senga	Selva	Elkat	Dukat
Acidez titulável (g ácido cítrico/100g)	0,74	0,69	0,85	0,87	1,18	1,26
Açúcares totais (g/100g)	14,67	13,48	11,10	10,76	10,65	12,88
Sacarose (g/100g)	7,25	6,52	3,16	3,50	4,66	3,60

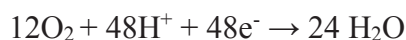
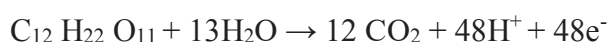
Vitamina C (mg L ⁻¹ /100g)	54,00	87,00	78,00	78,00	85,80	84,00
Compostos fenólicos totais (mg ácido gálico/100g)	443,4	372,2	317,2	423,3	407,4	410,5
Atividade antioxidante (mg DPPH)	0,040	0,040	0,047	0,044	0,041	0,038
Sólidos solúveis (°Brix)	13,6	13,1	14,8	12,4	11,9	18,0
Massa fresca (%)	13,42	12,28	14,73	13,53	11,90	16,68

Adaptado de: Skupień e Oszmiański, 2004.

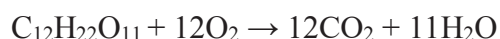
1.2. Maturação

O processo de maturação envolve reações químicas complexas, com alterações fisiológicas, metabólicas, bioquímicas e estruturais perceptíveis pela mudança de características organolépticas (Kerbauy, 2008). As mudanças ocorridas nas frutas durante o desenvolvimento, maturação e senescência se diferenciam segundo o tipo de respiração vegetal característica.

A respiração vegetal é um processo biológico onde compostos orgânicos reduzidos são mobilizados e subsequentemente oxidados de maneira controlada. Durante a respiração a energia liberada é incorporada na forma de ATP, prontamente utilizada na manutenção e crescimento. Ela pode ser representada sob a seguinte equação:



Reação líquida:



$$\Delta G' = -1380 \text{ KCal/mol}$$

A energia é liberada em três etapas durante a respiração, são elas: a glicólise, o ciclo do ácido cítrico e a cadeia de transporte de elétrons.

Na glicólise ocorre uma série de reações executadas por conjunto de enzimas, onde um açúcar é parcialmente oxidado via açúcares fosfato de seis carbonos (hexoses

fosfato) e açúcares trioses fosfato, para reduzir um ácido orgânico. Resultando em um pequeno saldo de energia na forma de ATP e poder redutor como NADH. A segunda etapa trata-se do ciclo do ácido cítrico, onde um piruvato é completamente oxidado a CO₂, gerando um considerável poder redutor. A etapa final é a cadeia de transporte de elétrons. Ao longo das duas etapas iniciais os elétrons liberados foram aceitos pelo NADH e FADH₂, estes são agora transferidos para o oxigênio, e a cada vez que isto acontece forma-se uma molécula de ATP, que ao final do ciclo totaliza 38 moléculas de ATP.

Com diferentes substratos envolvidos na fase de glicólise pode-se medir a quantidade relativa de CO₂ liberado e O₂ consumido, chamado quociente respiratório (taxa respiratória), QR, que é dado pela equação:

$$QR = \text{moles de CO}_2 \text{ liberado} / \text{mole de O}_2 \text{ consumido}$$

Desta maneira diferentes substratos geram diferentes taxas respiratórias. E de forma geral refletem o nível de demanda metabólico, bem como a fase da planta (estádios iniciais e de desenvolvimento requerem maior quantidade de energia) e no caso dos frutos experimentam um pico respiratório chamado de climatério.

Assim, as frutas classificadas segundo o tipo de respiração, climatéricas e não climatéricas, possuem rotas metabólicas ativadas por diferentes fitormônios e condições ambientais, necessitando de diferentes tratamentos principalmente relacionados à pós-colheita e tempo de prateleira.

Em frutos climatéricos, o amadurecimento é induzido pelo etileno, que é um hormônio gasoso responsável pela rapidez e coordenação da maturação, mesmo no período pós-colheita. Porém, os frutos não climatéricos possuem uma baixa produção de etileno, assim a maturação ocorre por outras vias bioquímicas que são desencadeadas por condições externas, tais como: luz, temperatura e ação isolada ou conjunta de outros hormônios (Abdi *et al.*, 1998).

Na fase pré-colheita a atividade da planta é mantida pela atividade fotossintética e na pós-colheita esta atividade é mantida por reserva de amido ou de açúcares, dependendo da espécie da fruta. Assim, sua vida útil pós-colheita dependerá do consumo de sua reserva energética. Este consumo é dado pela taxa de respiração, quanto maior for a taxa de respiração menor será sua vida útil pós-colheita. O pico da

curva respiratória indicará o ponto ideal de colheita, após este ponto, a curva decresce e indica a senescência do fruto (Pinheiro, 2009).

Para frutos não climatéricos, pode-se observar que a taxa respiratória (Figura 1) não possui pico de produção de etileno durante a maturação, resultando na baixa taxa respiratória no mesmo período. Como consequência disso frutos com esta classificação não são capazes de dar continuidade a maturação no período pós-colheita, passando a senescência do fruto, o que reduz consideravelmente o tempo de prateleira deste, quando comparadas a frutos climatéricos.

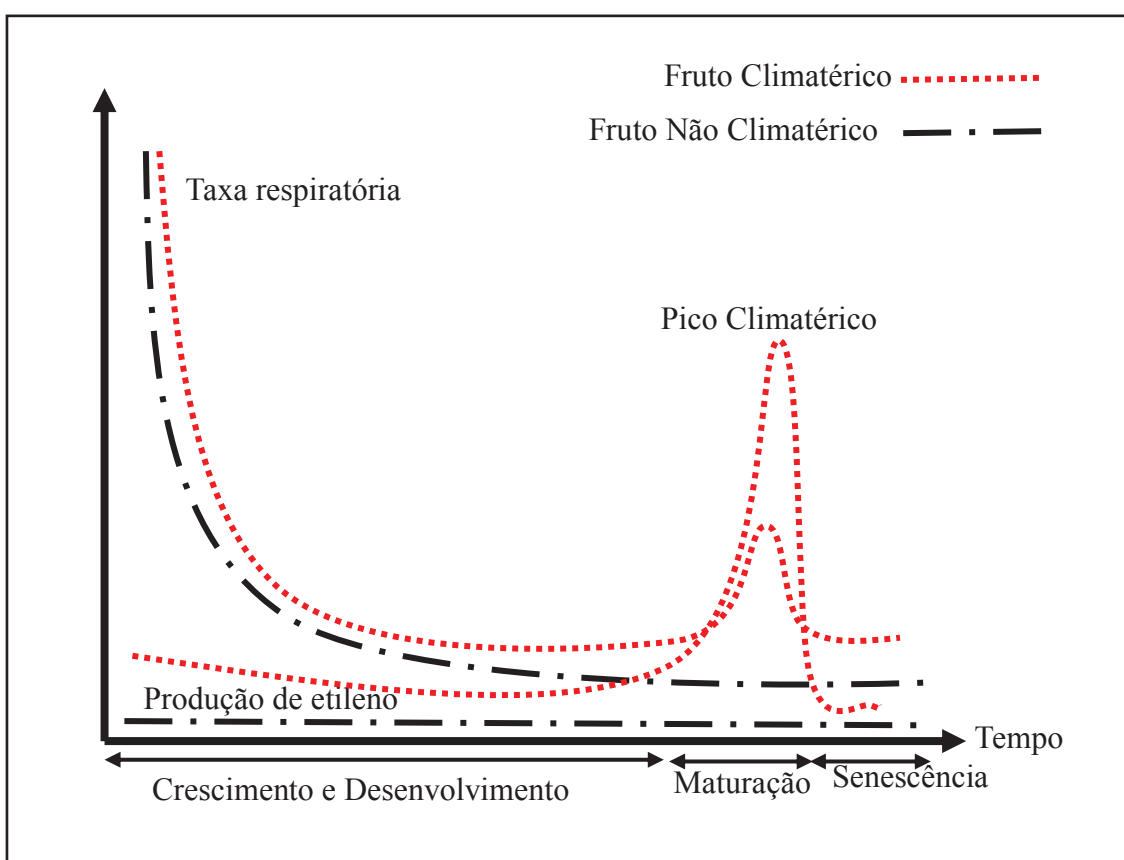


Figura 1: Taxa respiratória de frutos climatéricos e não climatéricos.

O fruto do morangueiro é do tipo não climatérico, dessa forma após a colheita não ocorre amadurecimento e suas características organolépticas não melhoram, iniciando a senescência do fruto (Chitarra e Chitarra, 2005). Devido a estes fatores, o morango deve ser colhido maduro, que aliado com a alta perecibilidade e delicadeza do fruto, reduz seu tempo de armazenamento. Quando comparado a outros vegetais (Figura 2), o morango possui alta taxa de respiração e baixa longevidade pós-colheita.

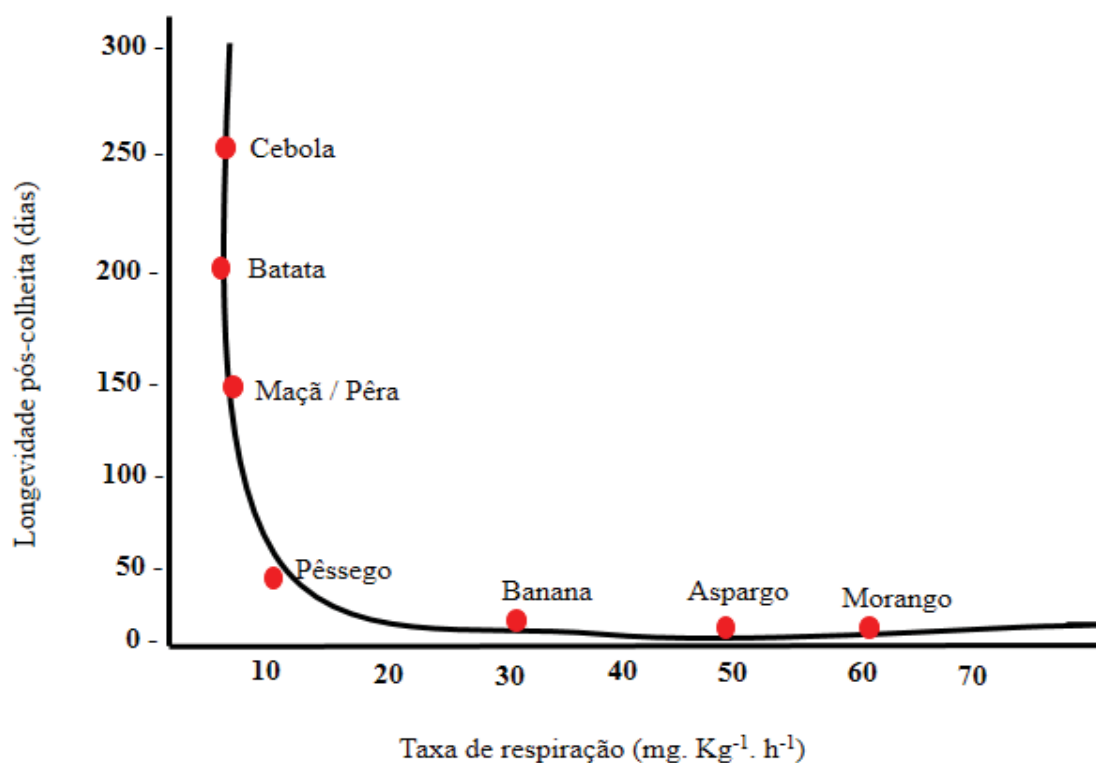


Figura 2: Gráfico de taxa de respiração.

Um dos processos mais importantes durante a maturação é a mudança de coloração, causada pela decomposição da clorofila e biossíntese de compostos responsáveis por tais características. As clorofilas (*a* e *b*) são formadas por uma estrutura macrocíclica assimétrica e insaturada, é composta por quatro anéis pirrol, tendo magnésio como átomo central. Encontradas na natureza em uma proporção de 3:1 nas formas *a* e *b*, diferem-se pelo ligante R no anel II, sendo que a clorofila *a* é substituída por grupo $-\text{CH}_3$, e sua forma *b* substituída por grupo aldeído $-\text{COH}$.

A decomposição da clorofila ocorre durante a maturação devido modificações estruturais causadas pela ação enzimática. A perda total de cor relacionada a maturação envolve a abertura do anel tetrapirrólico com a introdução de oxigênio num processo co-oxidativo catalisado pela enzima feoforbídeo a mono-oxigenase, gerando produtos incolores (Figura 3). A etapa inicial da degradação das clorofilas em tecidos senescentes é iniciada por fatores externos, como o estresse hídrico, luminosidade, alterações térmicas, níveis aumentados de etileno ou a combinação destes fatores (Pruzinska *et al.*, 2003; Streit *et al.*, 2005).

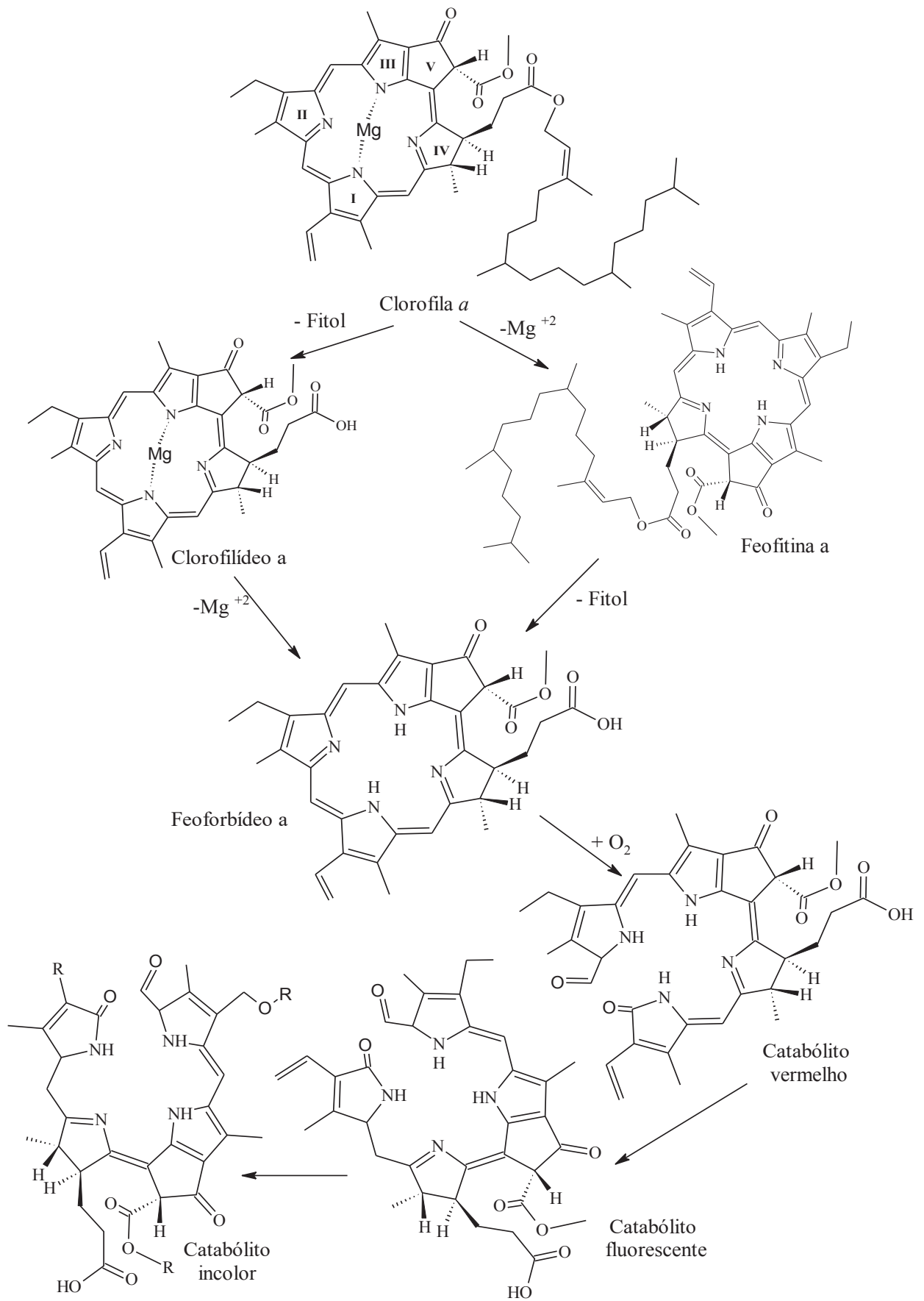


Figura 3: Esquema de degradação da clorofila *a*.

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de substâncias que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas. Sua composição em frutas pode variar de acordo com a fase de maturação, ambiente de plantio e condições de estocagem (Menz *et al.*, 2010). Várias rotas metabólicas estão envolvidas na biossíntese dos compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico está entre as principais envolvidas na maturação de frutas (Iaderoza *et al.*, 1992; Menezes, 2005).

A fenilalanina é um dos precursores de grande parte dos compostos fenólicos presentes nas frutas, estes são formados pela eliminação de uma molécula de $-NH_3$ para formar ácido cinâmico (Figura 4). Tal reação é catalisada pela fenilalanina amonialiase, caracterizando esta como uma etapa reguladora na formação de muitos compostos fenólicos. Sendo que a atividade enzimática da fenilalanina amonialiase é influenciada por fatores externos como o baixo nível de nutrientes, temperatura, luz e infecções, desta maneira quando a planta sofre qualquer tipo de estresse externo desencadeia-se a produção de compostos fenólicos com o objetivo de defesa da planta.

Estes tipos de compostos foram identificados em um estudo desenvolvido por Häkkinen e colaboradores (2000). Eles estudaram a influência do cultivar, local de cultivo, bem como técnicas de cultivo convencional e orgânico, no conteúdo de flavonóis e compostos fenólicos. Através de análises do extrato de morango por HPLC-DAD, eles quantificaram compostos como: canferol, quercetina, ácidos elágico e *p*-cumárico. Eles observaram uma pequena variação no conteúdo de *p*-cumárico segundo o tipo de cultivar, e segundo os autores não houve diferença entre o tipo de cultivo convencional e orgânico.

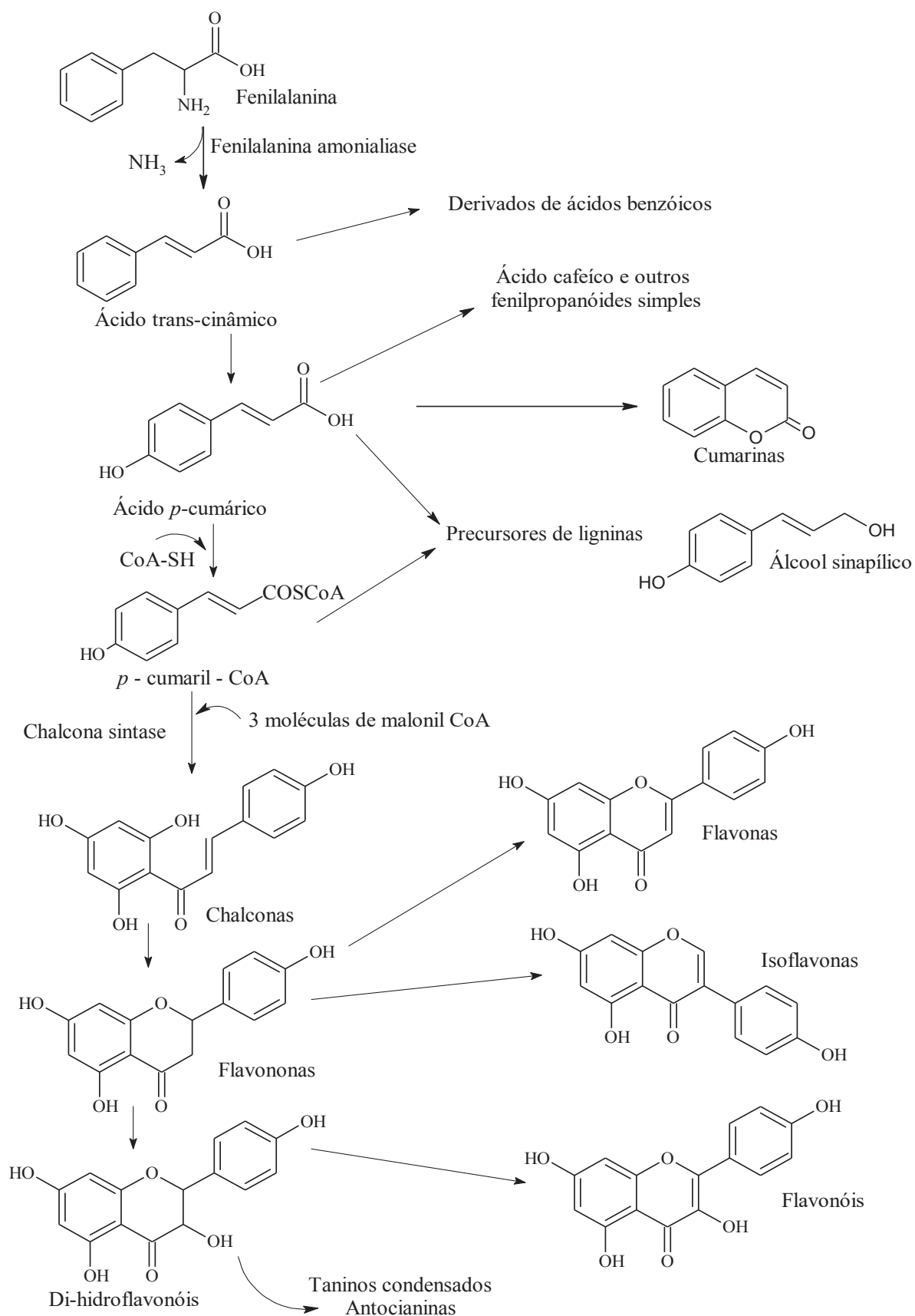


Figura 4: Esquema de biossíntese de compostos fenólicos.

Fonte: Lanfer-Marquez, 2003.

Constituindo uma das maiores classes de compostos fenólicos, os flavonóides têm diversas funções dentro do metabolismo da planta. Compostos como flavonas, flavonóis e antocianinas são responsáveis pela cor atrativa nos frutos, e seu acúmulo ocorre durante o período de maturação indicando também o período ideal para colheita, que pode variar para frutos climatéricos, em que o fruto pode ser colhido no início da maturação, e não climatéricos, fruto deve ser colhido com o processo de maturação completo (Huber *et al.*, 2008).

Estes compostos ainda possuem atividade antioxidante devido a sua propriedade redutora, cuja intensidade está relacionada com a sua estrutura química e ao número e posição de hidroxilas presentes na estrutura. Tais estruturas atuam em diferentes níveis de oxidação, podendo agir diminuindo a concentração de oxigênio, interceptando a ação de oxigênio singlete, evitando a fase de iniciação da oxidação pelo sequestro de radicais hidroxil; quelando íons metálicos dentre outros processos de deterioração que levam a produção de sabores, odores, descoloração e alterações que alteram a qualidade nutricional e a segurança alimentar da fruta pela produção de compostos tóxicos.

Os flavonóides possuem estrutura composta por 15 carbonos, distribuídos em dois anéis benzínicos (anel A e B), ligados por um anel pirano (anel C), que possui oxigênio como heteroátomo (Figura 5). As subclasses de flavonóides diferem entre si devido a posição e tipo de substituintes, grau de insaturação. Devido a estrutura ressonante, possui atividade antioxidante. Também possuem propriedades absorptivas de ultravioleta, protegendo a planta contra a radiação ultravioleta do sol.

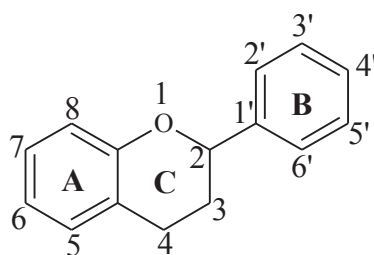


Figura 5: Estrutura geral dos flavonóides.

As antocianinas são glicosídeos de flavonóides que apresentam açúcares na posição 3 (Figura 6) e, algumas vezes, em outras posições. Sem seus açúcares, as

antocianinas (aglicona) são conhecidas como antocianidinas. A cor das antocianinas (responsável principalmente pelas cores azul, roxo e vermelho) se deve principalmente pela ressonância do íon flavílio que gera a intensidade de cor, já que a duplas ligações fazem com que absorva na região de 500 – 600 nm. Também pode ser influenciada por muitos fatores, incluindo o número de grupos hidroxila e metoxila no anel B da antocianidina, a presença de ácidos aromáticos esterificados ao esqueleto principal e o pH do vacúolo na qual tais compostos estão armazenados. As antocianinas podem também ocorrer em complexos supramoleculares junto a íons metálicos quelados e a co-pigmentos flavonas e dois íons magnésio associados (Malacrida *et al.*, 2006).

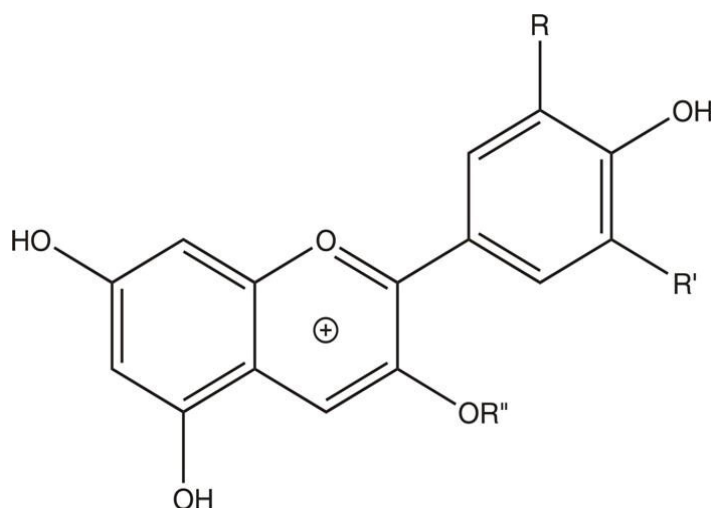


Figura 6: Estrutura básica das antocianinas (cátion flavílico).

Sua estabilidade está associada aos substituintes. Antocianidinas são estruturalmente menos estáveis que antocianinas devido à ausência do açúcar (R^1 , a presença do açúcar aumenta a estabilidade do anel, devido ao aumento do número de ligações duplas ocorre o aumento da ressonância), além disto, um maior número de hidroxilas diminui a estabilidade, o inverso ocorre com os grupos metoxilas. Outro fator é o pH, que causa alterações no cátion flavílico, alterando assim sua coloração, as antocianinas são mais estáveis em pH neutro do que em soluções ácidas e básicas. Além destes, temperatura de armazenagem, presença de algumas enzimas, luz, oxigênio, entre outros, também são fatores importantes na estabilidade das antocianinas.

Na maturação dos frutos, o amolecimento reflete essencialmente a ocorrência de alterações progressivas nas paredes celulares, fazendo com que elas se tornem mais hidratadas e moles. A parede celular em frutos é composta principalmente por pectinas (Figura 7), hemicelulose e celulose. Pectinas são polímeros de polissacarídeos compostos por ácido galacturônico parcialmente esterificados, unidos por ligação α (1 \rightarrow 4), podendo apresentar ramificações como os açúcares: galactose, glicose, ramnose, arabinose e xilose. A despolimerização e a solubilização enzimática das pectinas da lamela da parede celular têm como resultado uma considerável perda de adesão entre as células, determinando a textura dos frutos (Argenta *et al.*, 1994).

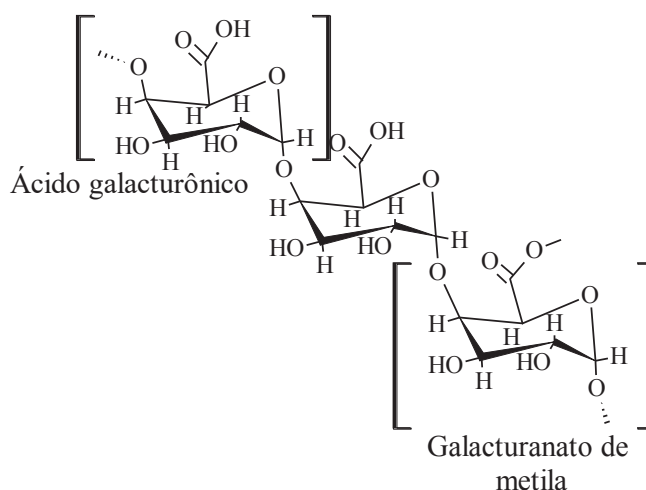


Figura 7: Estrutura química da cadeia de pectina.

Os compostos responsáveis pelo aroma de morango, são em sua maioria substâncias voláteis que aumentam com tempo de maturação. E em sua maioria são compostos por ésteres, aldeídos, cetonas, terpenos, álcoois e derivados de lactonas. O sabor e o aroma dos frutos resultam de complexas interações entre substâncias de diversas naturezas, alguns voláteis, como ésteres, aldeídos e álcoois, e outras não voláteis, como açúcares e ácidos orgânicos (Peinado *et al.*, 2013).

O amido, principal polissacarídeo de reserva do reino vegetal, é acumulado por plantas verdes sob a forma de grânulos, em uma grande variedade de raízes, tubérculos, folhas, troncos, sementes, frutos e pólen. Quando hidrolisado o amido produz glicose,

que por sua vez é oxidada nas reações subsequentes. E as reações de hidrólise ocorrem em consequência de variações sazonais ou estádios de desenvolvimento específicos (estádio: Fase no desenvolvimento da planta ou do animal), tais como: o começo da primavera para raízes e cascas de árvores e o início de amadurecimento. Também se tem a minimização de outros parâmetros importantes durante o amadurecimento, como a perda de peso devido à diminuição da taxa respiratória; de distúrbios fisiológicos, como escaldaduras; de podridões provocados por micro-organismos, essas decorrentes de perdas das propriedades fungistáticas do fruto saudável (Pinheiro, 2009). A Figura 8 apresenta os estados de desenvolvimento e maturação de frutas:

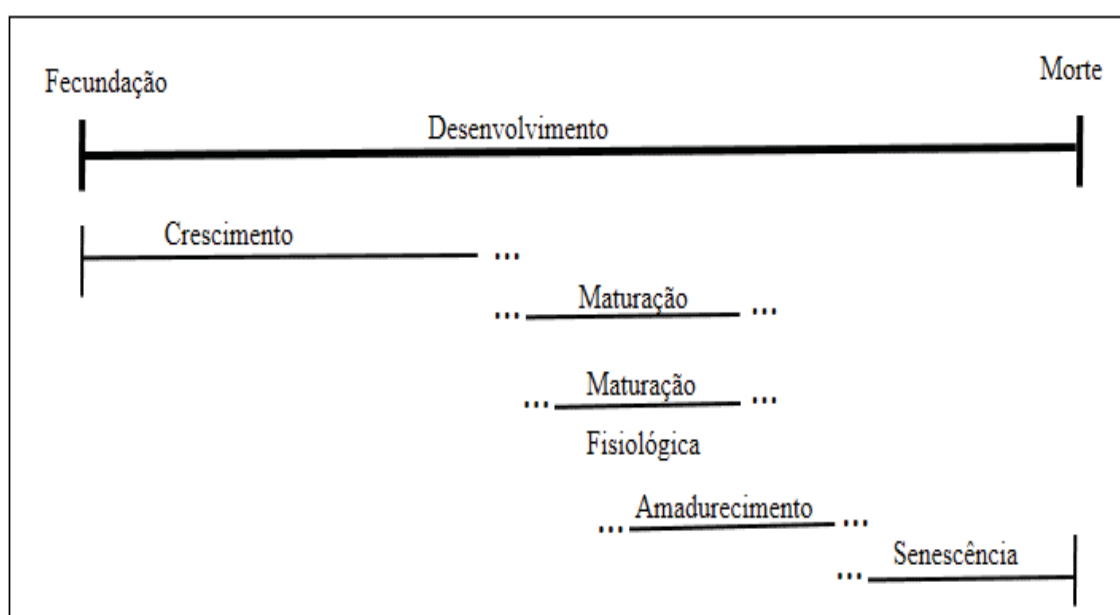


Figura 8: Diagrama esquemático indicando os estádios de desenvolvimento fruto.

O processo de desenvolvimento é marcado principalmente pela formação de tecido novo. O crescimento é uma fase caracterizada por mudanças irreversíveis nas características físicas do fruto. Inicia-se por divisão celular e, posteriormente, por expansão celular que é responsável pela última parte do aumento do volume do fruto. Dessa forma, o tamanho final do fruto é consequência do aumento do número de células, bem como do aumento no tamanho médio dessas células (Chitarra e Chitarra, 2005).

Juntamente com a fase de crescimento, inicia-se a fase de maturação dos frutos. Esta fase conduz os mesmos à maturidade fisiológica, ou seja, leva-os a um estado que

os tornam comestíveis. Durante tal fase ocorre a chamada maturidade fisiológica dos frutos. Em geral, neste estágio as frutas apresentam características de qualidade para utilização pelo consumidor. A fase final da maturação é marcada pelo período inicial da fase de amadurecimento dos frutos (Chitarra *et al.*, 2005).

O amadurecimento é considerado como o aprimoramento do conjunto de processos que ocorreram nos últimos estádios de desenvolvimento do fruto, até as etapas iniciais de sua senescência. Caracterizado por mudanças de natureza bioquímica, resultam em características estéticas e de qualidade para o fruto, como evidenciado pelas mudanças na sua composição, na cor, na textura e em outros atributos sensoriais (Primo, 2008).

A senescência é um processo irreversível, esta fase pode ocorrer tanto antes como após a colheita e é caracterizada por processos fisiológicos e químicos, que ocorrem após a maturidade fisiológica. Estas transformações são predominantemente degradativas, culminando com a morte dos tecidos (Chitarra e Chitarra, 2005).

O período de desenvolvimento e maturação do morango é determinado por quatro períodos fenológicos (Figura 9).

- Fruto verde (1), em que fruto está em desenvolvimento;
- Fruto branco (2), com 50% do período de maturação concluído;
- Fruto rosa (3), com 75% da maturação;
- Fruto vermelho (4), fruto com 100% da maturação completa.



Figura 9: Imagem dos períodos fenológicos do morango, 1) verde; 2) branco; 3) morango rosa e 4) morango vermelho.

Fonte: Pinelli, 2009.

Com tantas mudanças na composição química das frutas durante o processo de maturação é de grande importância a avaliação destes compostos nos estádios de pré e

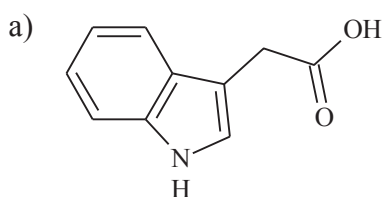
pós-colheita, com objetivo de aumentar a produtividade, prolongar tempo de prateleira, com a manutenção das propriedades benéficas a saúde.

1.3. Fitormônios

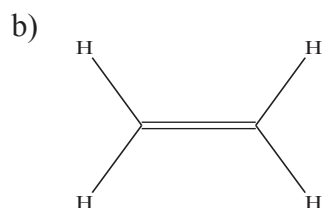
As fases de desenvolvimento, maturação e senescência das plantas são regidas pelo tipo de respiração da planta. Plantas com características climáticas possuem respiração vegetal com pico de produção de etileno no auge do período de maturação (no caso de frutas), portanto, toda a maturação é regida por tal fitormônio. Porém, existe também a ação de outros fitormônios durante os estados de desenvolvimento e maturação, entretanto, em menor proporção. Plantas com características não climáticas possuem respiração vegetal sem um pico de produção de etileno, deste modo, o desenvolvimento do fruto ocorre sob a ação coordenada de diferentes fitormônios e condições ambientais. Portanto, é de grande importância a compreensão da ação dos mesmos durante os estados de desenvolvimento, maturação e senescência (Kerby, 2008).

Os fitormônios vegetais são substâncias formadas por pequenas moléculas produzidas pela planta e que em pequenas concentrações, geram mudanças metabólicas nas células. O seu transporte é realizado pelos vasos condutores de seiva (Xilema e Floema) e podem atuar diretamente no órgão onde foram produzidos.

Os principais fitormônios vegetais são auxinas, giberelinas, citocininas, brassinolídeo etileno e ácido abscísico (Figura 10). Estes, por sua vez, desempenham diversas funções, tais como: os estímulos ao crescimento da planta, à floração, à formação, desenvolvimento e amadurecimento dos frutos, à formação dos tecidos vegetais, promovem a adaptação da planta às condições de falta de água (estresse hídrico) e estimulam a germinação e a quebra (ou indução) da dormência (Cavalini, 2008).



Ácido indol- 3 acético
(Auxina)



Etileno

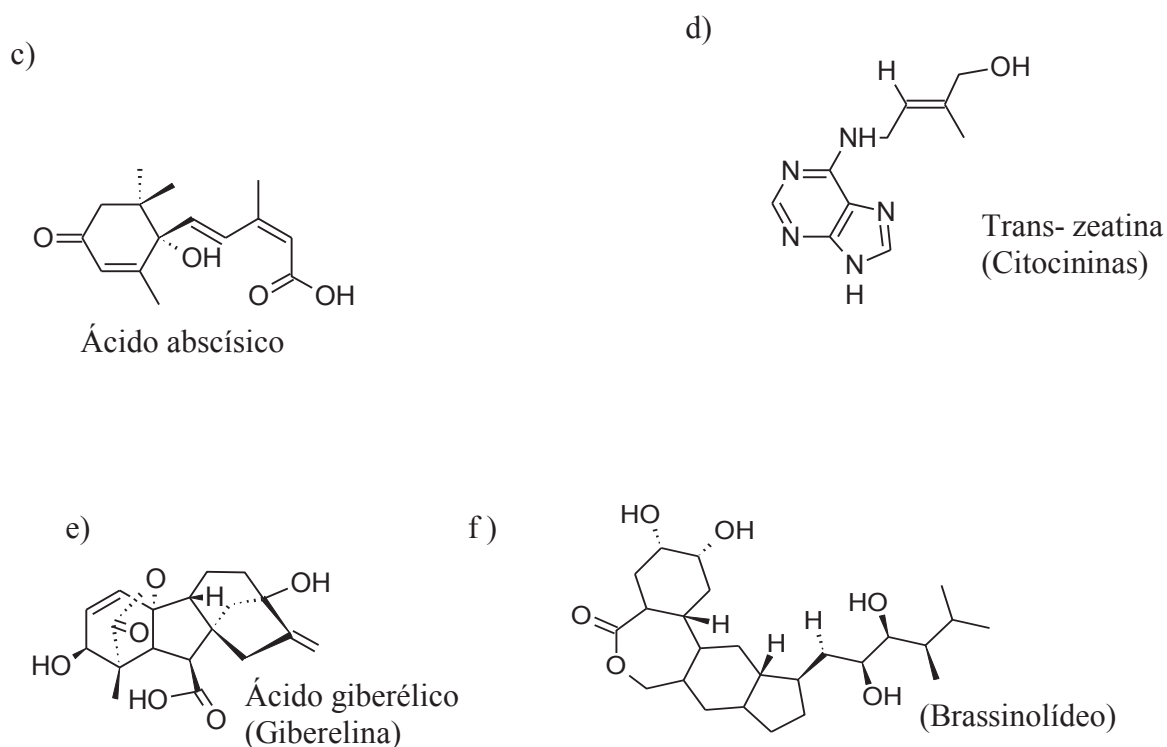


Figura 10: Estrutura química dos fitormônios.

O morango é classificado como fruto não climatérico, segundo o tipo de respiração. Caracterizada pela ausência de pico de produção de etileno, o seu desenvolvimento e maturação são desencadeados principalmente por condições externas como luminosidade, temperatura, nível pluviométrico; pela ação de outros hormônios vegetais, como as auxinas, giberelinas, ácido abscísico e etileno, ou pela ação combinada de tais substâncias (Trainotti *et al.*, 2005; Hytonen *et al.*, 2009; Csukasi *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Symons *et al.*, 2012).

O etileno é o único gás que participa da regulação de processos fito fisiológicos, sendo difundido através de espaços intermoleculares para o interior do tecido atuando assim em toda a planta. Considerado um hormônio, já que é um produto natural do metabolismo, atua em concentrações muito baixas e participa da regulação de praticamente todos os processos de crescimento e maturação. E quando ocorre a aplicação de etileno exógeno em frutos não climatéricos, ele catalisa a taxa respiratória, mas não existe a aceleração da maturação.

Este é responsável pelo início da maturação, e sua produção tem como objetivo acelerar e tornar uniforme a maturação de frutos climatéricos. As principais mudanças observadas são amolecimento do fruto, devido à quebra enzimática das paredes celulares, a hidrólise do amido com consequente acúmulo de açúcares e a diminuição de ácidos orgânicos (Payasi *et al.*, 2010).

O ácido abscísico (ABA) é um fitormônio que desencadeia o processo de abscisão ou queda de frutos e folhas, pela sua capacidade de estimular a produção de etileno, além de regular alguns aspectos importantes do desenvolvimento da planta, incluindo a síntese de proteínas de reserva e lipídeos nas sementes, atua na resposta adaptativa a condições adversas. O ABA pode agir estimulando o fechamento dos estômatos (diminuindo a transpiração) ou, em situações de extrema falta de água, estimulando a produção de etileno. Ele também responsável por promover o metabolismo e acúmulo de açúcares (Pan *et al.*, 2005), estimula a biossíntese de etileno encurtando o tempo para o início da maturação (Parikh *et al.*, 1990).

Os brassinosteróides (Figura 10 f)) são hormônios vegetais que promovem o alongamento celular, expansão celular, promovendo aceleração do crescimento, resistência ao estresse, a diferenciação do xilema e o retardamento da abscisão das folhas (Chai *et al.*, 2013).

A literatura apresenta vários estudos relacionados a ação de tais hormônios em frutas, mas ainda não está claro os mecanismos de ação dos mesmos, principalmente em frutos não climatéricos.

Alterações causadas na maturação do morango, estão associadas a ação do etileno em estágio de maturação branco, onde o fruto atinge o tamanho final e inicia o acúmulo de antocianinas, o que está de acordo com Villarreal e colaboradores (2010) que observaram o acúmulo de antocianinas e a degradação da clorofila, quando os frutos de morangos foram tratados com o etileno. Bombarely e colaboradores (2010) identificaram vários genes ligados a percepção e a biossíntese do etileno e de outros reguladores de crescimento no amadurecimento no morango. Sun e colaboradores (2013) demonstraram que o gene *FaCTR1*, componente da cadeia de transdução de sinais, e o gene *FaSAMS1*, da via biosintética do etileno, regulam o amadurecimento, demonstrando a necessidade do etileno para o amadurecimento do fruto.

Em morango, são poucas as evidências substanciais da ação e do conteúdo ativo de brassinosteróides envolvidos no amadurecimento do fruto. A aplicação exógena de brassinolídeo amadureceu o fruto verde de morango, sugerindo o seu papel no desenvolvimento inicial do fruto (Chai *et al.*, 2013). A expressão diferencial do gene *FaBR11*, envolvido na sinalização de brassinolídeo em receptáculos vermelhos, sugeriram um aumento na concentração desse hormônio neste tecido, quando o fruto se encontra em estádios avançados da maturação (Bombarely *et al.*, 2010). Symons e colaboradores (2012) relataram que o mesmo não está envolvido no amadurecimento do morango. Já em uvas (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon, mudanças na expressão de genes controlando a síntese e o nível endógeno de brassinolídeo, se tornaram evidentes ao longo do desenvolvimento da baga com a aplicação exógena de *epi*-brassinolídeo, que promove ou retarda o amadurecimento das mesmas.

Diante desses resultados é possível observar que o papel desempenhado pelo etileno, brassinosteróide e outros hormônios vegetais, tais como o ácido abscísico tem sido investigado em muitas das pesquisas voltadas à regulação do amadurecimento do fruto de morangueiro. E essa cultura, tem se tornado um sistema útil em estudos destinados ao entendimento da ação hormonal em frutos, não só pela sua importância econômica e nutracêutica, mas também diante da sua fácil propagação, do curto estágio vegetativo, do rápido desenvolvimento e por ser um fruto pequeno (Perkins-Veazie, 1995).

Para este estudo foram observados os efeitos de três fitormônios ligados a diferentes ações durante o desenvolvimento e maturação do morango, sendo eles etileno (ETHEFON®), ácido abscísico e a tentativa de caracterização da ação do 3-*epi*-brassinolídeo (Figura 10).

1.4. Metabolômica

Visando uma melhor compreensão das rotas biossintéticas envolvidas nos diferentes processos na planta, através da identificação de seus metabólitos, o estudo metabolômico oferece informações que possibilitam aprimorar técnicas de armazenamento, tratamentos pré e pós-colheita de frutas, bem como avaliar o efeito de condições externas na composição química dos mesmos.

A caracterização de alimentos através de um *fingerprint* é uma estratégia utilizada em muitos casos. Uma visão geral da composição química, que possibilita diversos focos de estudo, desde a variabilidade da composição nos estádios de desenvolvimento, maturação e senescência; alterações ocorridas devido a processamento de alimentos; caracterização geográfica, origem e cultivar; caracterização de fenótipos e genótipos; modificações genéticas entre outros.

Em levantamento de dados Fotakis e colaboradores (2013) apresentaram diversos estudos com foco nos metabólitos da baga e derivados de uva que relataram metabólitos caracterizados principalmente em resíduos da indústria de sucos e o mosto da indústria de vinhos e produtos finais como suco, vinho, vinagre e destilados. Tais dados indicaram uma gama de compostos envolvidos nestes processos, bem como, a caracterização dos efeitos do solo, origem geográfica, variedade e tempo de envelhecimento. Dentre os compostos apresentados pelos autores estão uma série de aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e compostos fenólicos, comumente encontrados em frutas. Foi ainda constatada a presença de metabólitos secundários como ácido sirínico, característico composto fenólico responsável por inferir resistência da planta principalmente contra-ataques de herbívoros. Este trabalho ressaltou o esforço de pesquisadores no estudo metabolômico e reconhecimento metabólico de cultivares e produtos derivados de uva.

Os diferentes estados de maturação do pimentão foram estudados identificando metabólitos em cada estágio (Aizat *et al.*, 2014). Foram caracterizados compostos como amido, açúcares e derivados como principais compostos alterados durante o amadurecimento. Os autores identificaram que os compostos indicados como marcadores de maturação também influenciam compostos intermediários da glicólise e consequentemente vias metabólicas de aminoácidos, compostos relacionados à cor, pungência e ainda metabólitos secundários envolvidos no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Ainda correlacionaram a ação de compostos como a cisteína e metionina, à produção de etileno, aumentando sua concentração no decorrer da maturação, enquanto a putrescina diminui. Estes resultados caracterizam rotas metabólicas características de fruto não climatérico.

Savorani e colaboradores (2010) identificaram metabólitos de peixe diferenciando por diferentes aquiculturas. Eles identificaram a inosina como biomarcador para avaliar

tempo de armazenamento e metabólitos como glicogênio, alanina e glicina como biomarcadores dos diferentes sistemas de aquicultura.

O estudo do metaboloma possibilitou o melhor entendimento das principais mudanças ocorridas durante os mais diferentes processos bioquímicos ocorridos. Tal entendimento possibilita o desenvolvimento de novas técnicas de tratamentos com as mais diversas finalidades.

1.5. RMN

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma ferramenta poderosa e versátil para a elucidação estrutural de compostos orgânicos, acompanhamento de meios reacionais, caracterização de compostos em matrizes complexas dentre uma gama de possibilidades oferecida por esta ferramenta. Desde o seu surgimento em 1945, a RMN tem sofrido grandes transformações tais como o desenvolvimento de ímãs supercondutores, que permitem obter campos magnéticos cada vez mais intensos e, com isso aumentar a sensibilidade dos espectrômetros de RMN; a transformada de Fourier que possibilitou o uso da técnica pulsada e com isso acumular vários FIDs (*Free Induction Decay*) e mais recentemente de sondas com gradiente de campo, as quais permitiram melhorar significativamente a qualidade dos experimentos (Claridge, 1999).

A espectroscopia de ressonância nuclear se baseia nas propriedades magnéticas do spin, que são baseadas no conceito de spin nuclear e momento magnético. O spin nuclear resulta da relação entre prótons e elétrons no núcleo, quando ambos são pares essa combinação gera spin nuclear nulo e inativo para o fenômeno de ressonância, entretanto, quando esta relação elétrons e prótons é diferente de zero o núcleo assume orientações permitidas para o spin nuclear. Neste caso quando aplicado um campo magnético intenso ocorre a degenerância dos estados energéticos (+1/2 e -1/2), e a distribuição eletrônica nos estados ocorre com uma pequena diferença entre eles, e esta diferença pode ser medida por RMN (Daiolo, 2006).

1.5.1. Técnica de High Resolution Magic Angle Spinning (HR-MAS)

O surgimento de sondas com giro em torno do ângulo mágico (MAS) possibilitou a análise direta de materiais sólidos. Posteriormente, o desenvolvimento de sondas de alta resolução com giro no ângulo mágico (HR-MAS, *High Resolution* -

Magic Angle Spinning) tem permitido a aquisição de espectros de RMN de ^1H diretamente de materiais *in natura*, tais como, tecidos vegetais e animais com resolução espectral muito semelhante às obtidas para amostras em solução, ampliando cada vez mais o seu campo de atuação (Daolio, 2006). A técnica de HR-MAS reúne as vantagens de RMN em líquidos com RMN de amostras sólidas, possibilitando a combinação das características mais importantes destas duas técnicas, como a alta resolução obtida por RMN em solução e a necessidade do mínimo de preparo de amostra inerente a RMN de sólidos.

Os espectros de amostras no estado sólido obtidos nas sondas convencionais devido ao movimento molecular restrito e a heterogeneidade física da amostra produzem sinais extremamente alargados. Este alargamento se deve a três situações: acoplamento dipolar, deslocamentos químicos anisotrópicos e diferenças na susceptibilidade magnética da amostra.

A interação magnética dos spins nucleares através do espaço sem o intermédio de átomos e elétrons, chamado acoplamento dipolar, depende da posição que cada núcleo ocupa, e de acordo com esta posição o campo magnético gerado pelo spin pode ser somado ou subtraído ao campo magnético aplicado ao vizinho, fazendo com que um único núcleo apresente várias frequências de ressonância e, conseqüentemente, alargamento dos sinais.

A distribuição assimétrica dos elétrons nas ligações e o movimento molecular restrito das amostras sólidas fazem com que um mesmo núcleo apresente deslocamentos químicos distintos provenientes das diversas orientações que a molécula pode assumir em relação ao campo magnético do equipamento, contribuindo para o alargamento dos sinais, fenômeno chamado deslocamento anisotrópico.

A falta de homogeneidade física de amostras sólidas gera diferenças na suscetibilidade magnética, assim núcleos idênticos podem apresentar diferentes frequências dependendo da posição em que se encontra a amostra, gerando novamente deslocamentos químicos anisotrópicos e alargamento dos sinais. O movimento restrito de amostras sólidas também causa efeitos no tempo de relaxação, fazendo com que o tempo de relaxação rede-spin seja longo e a relaxação spin-spin seja curto, ocasionando um alargamento do sinal.

Alguns destes efeitos são reduzidos com três condições de aquisição dos espectros: orientação da amostra em um ângulo de $54,74^\circ$ em relação ao campo magnético do equipamento (B_0) e rotação da amostra em alta frequência e fina moagem da amostra.

O alargamento causado pelo acoplamento dipolar (D) pode ser minimizado ao inclinar a amostra em um ângulo de $54,74^\circ$ (chamado ângulo mágico, figura 11) em relação ao campo magnético principal (B_0). Tal ângulo é resultado da dependência angular do acoplamento dipolar em relação ao campo, dado pela seguinte equação:

$$D \text{ proporcional a } \pm \mu_B r_{AB}^{-3} (3 \cos^2 \Theta - 1)$$

Desta maneira quando ângulo é de $54,74^\circ$ em relação a B_0 , o termo $3 \cos^2 \Theta - 1$ da equação torna-se zero, anulando assim o efeito do acoplamento dipolar. Entretanto apenas a inclinação da amostra não resulta em melhorias significativas na resolução dos espectros, a rotação da amostra elimina o alargamento causado pelo efeito do deslocamento químico anisotrópico, desde que a frequência de rotação seja ao menos igual ao deslocamento anisotrópico, e que ainda depende do campo aplicado, desta maneira quanto maior o campo aplicado, maior deverá ser a rotação da amostra. O efeito de alargamento dos sinais causados pela falta de homogeneidade da amostra pode ser minimizado com a fina moagem da amostra e pela disposição esférica dentro do rotor (porta amostra, figura 12). Assim os deslocamentos observados nos espectros são uma média das possíveis orientações que núcleo é exposto em relação ao campo magnético.

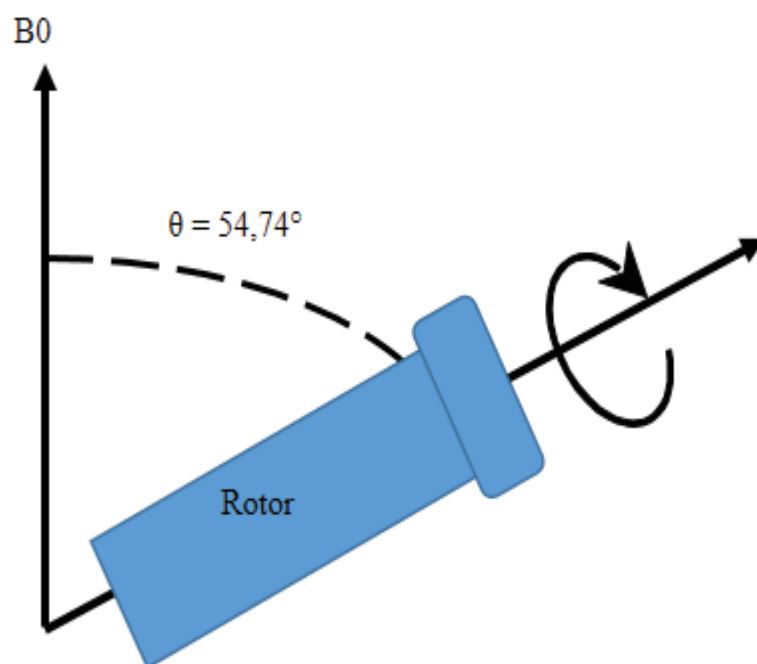


Figura 11: Representação esquemática do rotor girando no ângulo mágico ($54,74^\circ$).

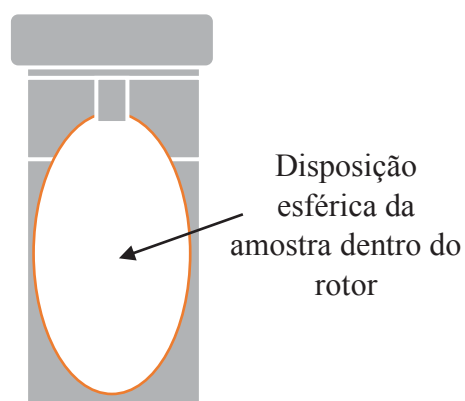


Figura 12: Representação esquemática do rotor utilizado na técnica de HR-MAS.

A grande vantagem da técnica de RMN HR-MAS é a possibilidade da análise direta de materiais intactos sem necessidade de nenhuma etapa de pré-tratamento de amostra, as quais consomem tempo e reagentes, além de poderem estar provocando alterações na composição química das amostras, por exemplo, em processos de extração. O principal requisito para que uma amostra seja analisada por esta técnica é

que as moléculas apresentem algum grau de mobilidade, consideradas como materiais heterogêneos. Condição já satisfeita nas amostras de tecidos animais e vegetais *in natura*.

A técnica também é sensível, requerendo somente alguns miligramas de amostra e alguns minutos para se adquirir um espectro de RMN de ^1H , possibilitando assim detectar componentes em concentrações inferiores a um micromolar em misturas (Broberg *et al.*, 2000). Além disso, as sondas de HR-MAS permitem o ajuste da homogeneidade do campo magnético (*shimming*), resultando em ganhos na relação sinal/ruído dos espectros obtidos (Broberg *et al.*, 1998).

1.5.2. Sequências de pulsos

As sequências de pulsos empregadas são as mesmas utilizadas na RMN de amostras em solução e não requer alta potência de desacoplamento ou técnicas especiais, comumente empregadas para sólidos verdadeiros (Garrod *et al.*, 1998). Assim as sequências mais empregadas em HR-MAS são sequências que envolvem saturação de sinais interferentes, como as sequências ZGPR, NOESYPR1D e excitação seletiva. Na análise de alimentos devido a natureza da amostra, é comum uma grande quantidade de água, o que interfere na intensidade de demais sinais, sendo necessária a saturação dos sinais dos hidrogênios da mesma.

Entretanto é necessário observar certos pré-requisitos na saturação do sinal dos hidrogênios da água. A saturação de tais sinais envolve o campo B_0 (campo magnético externo estático) e B_1 (campo magnético gerado quando aplicado pulso de rádio frequência). Neste sentido uma menor largura possível, da meia altura dos sinais, conseqüentemente maior homogeneidade do campo é necessária para que ocorra saturação, já que ao se aplicar um pulso de radiofrequência na região de sinais de hidrogênios da água, sinais com frequências de ressonâncias próximas podem ser saturados da mesma maneira, para que isto não ocorra é necessária uma boa calibração do pulso.

A sequência ZGPR é a mais simples para a saturação de sinais de hidrogênios da água. Utilizando um pulso seletivo de baixa potência na frequência de ressonância dos hidrogênios da água durante o tempo de relaxação, restando apenas um sinal residual de baixa intensidade.

A sequência de pulsos NOESYPR1D trata-se de uma sequência mais elaborada que suprime o sinal da água. Existe a aplicação de um pulso seletivo de baixa potência na frequência de ressonância dos hidrogênios da água durante a recuperação, da mesma forma que a sequência ZGPR, mas também pela aplicação adicional de um novo pulso seletivo de baixa potência também durante o tempo de mistura (Claridge, 1999).

A sequência de excitação esculpida, da mesma forma que a sequência ZGPR, utiliza pulsos seletivos para saturação de sinais. Porém, ao invés de pulsos retangulares como na ZGPR, a sequência de excitação esculpida utiliza pulsos seletivos formatados, tais como pulsos senoidais. Desta forma são mais seletivos para frequência de ressonância da água e por isso mais efetivos em saturar o sinal. Além disso, a sequência usa pulsos de gradiente de campo que visam retirar do plano transversal frequências de ressonância residuais da água. A principal vantagem desta sequência são espectros com pouca distorção de linha de base como na ZGPR.

As sondas de HR-MAS também possibilitam realizar experimentos bidimensionais tais como COSY, HSQC e HMBC que são extremamente úteis na identificação de compostos orgânicos, como demonstrado por Broberg e colaboradores (1998); Gil e colaboradores (2000) e Sacco e colaboradores (1998). Tais estudos possibilitaram a identificação de uma grande quantidade de compostos em diferentes materiais *in natura* sem quaisquer processos de extração e/ou purificação. Métodos de análise direta que dispensam a necessidade de isolamento dos componentes são muito desejáveis, e por esta razão o interesse da aplicação técnica de RMN HR-MAS é crescente (Ritota *et al*, 2012; Mucci *et al*, 2013; Solinas *et al*, 2014; Santos *et al*, 2015).

1.5.3. Aplicabilidade da técnica

Pesquisas realizadas na área de alimentos ainda se utilizam na maioria dos casos de análises físico-químicas como sólidos solúveis totais, acidez titulável, pH, açúcares solúveis totais, açúcares redutores, teste de amido, análises enzimáticas, fitoquímicos, taxa de respiração e testes físicos como firmeza, peso, cor e diâmetro requerem grande quantidade amostra, solvente e reagentes específicos para as diversas técnicas que podem ser empregadas (Haffner *et al.*, 2002; Cordenunsi *et al.*, 2005; Peretto *et al.*, 2014). Algumas delas exigem ainda elevado tempo para execução e ainda podem causar alterações dos seus componentes já que são técnicas invasivas, que quebram parede celular expondo seus componentes à degradação.

Por isso a aplicabilidade de técnicas espectroscópicas vem avançando na análise de alimentos, obtendo bons resultados de maneira precisa e rápida, exigindo pequena quantidade de amostra e possibilitando a análise *in natura*, o que impede alterações indesejadas.

Neste sentido Fang e colaboradores (2001) realizaram estudo sobre a estrutura molecular superficial (cutina) que protege plantas do ambiente externo com técnica de RMN HR-MAS, que ajudou a superar dificuldades de solubilização sem a degradação do polímero realizando análises *in natura*. Tal estudo possibilitou a caracterização de estruturas oligoméricas com extremidades ésteres e alcoóis primários, obtendo informações como peso molecular.

Spraul e colaboradores (2009) desenvolveram um método para o controle de qualidade de sucos de frutas por RMN, identificando componentes como asparagina, ácido málico e açúcares como glicose, frutose e sacarose em 50 tipos diferentes de sucos. Através da comparação com padrões eles puderam detectar fraudes como a adição de açúcar, tratamento enzimático exaustivo, marcadores como ácido galacturônico e ácido cítrico ou o suco de limão (por exemplo, no suco de maçã), uso de cascas, através do marcador phlorin, a utilização de frutos verdes, devido a altas concentração de ácido quínico em suco de maçã.

Gil e colaboradores (2000) estudaram a composição química da manga durante o amadurecimento utilizando a técnica de RMN HR-MAS. Através dos espectros de RMN de ^1H puderam observar 40 metabólitos em diferentes estádios de maturação, sendo que a sacarose é o açúcar predominante durante a maturação e o ácido cítrico, o ácido mais abundante em frutos ainda verdes diminuindo rápido com a maturação. Observaram ainda o aumento de compostos como alanina, lactato, fenilalanina e niacina durante a maturação e a mudança na região aromática dos espectros da polpa indicando uma complexa rota bioquímica dos compostos fenólicos com precursores como ácidos fórmico, gálico e chiquímico e tirosina.

1.6. Análise de Componentes Principais

Muitas vezes a análise de espectros de RMN provenientes de amostras com alto grau de semelhança (principalmente com alto número de amostras e replicatas) não

possibilita extrair informações relevantes apenas com uma inspeção visual. Desta maneira a análise de componentes principais (PCA) é uma ferramenta valiosa, pois possibilita a análise de um grande número de variáveis de maneira simultânea.

O método de análise de componentes principais tem como objetivo reduzir a dimensionalidade dos dados correlacionando as variáveis. Variáveis com alto grau de colinearidade são alta indicação de que é possível obter uma nova base que melhor explique a variância dos dados.

Estes dados são organizados em uma nova matriz de dados, na qual colunas representam as variáveis e as linhas representam as amostras, podendo assim esta nova matriz de dados ser representada por um conjunto de coordenadas espaciais. Cada novo vetor é expresso pela combinação linear das antigas variáveis, onde cada eixo é denominado componente principal (PC), sendo estes ortogonais entre si e ordenados em termos de quantidade de variância explicada. Desta maneira o primeiro componente principal explica maior variância dos dados e assim por diante.

Os dados são organizados em dois tipos de gráficos, gráficos de *scores* e *loadings* (Figura 13). O gráfico de *scores* que relaciona informações relativas aos agrupamentos das amostras, que são organizadas por grau de similaridade. No gráfico de *loadings* é possível identificar quais variáveis são responsáveis por um determinado agrupamento. Portanto, a análise conjunta dos gráficos possibilita a identificação e caracterização de cada grupo de amostras (McKenzie *et al.*, 2011; Kjeldahl *et al.*, 2010).

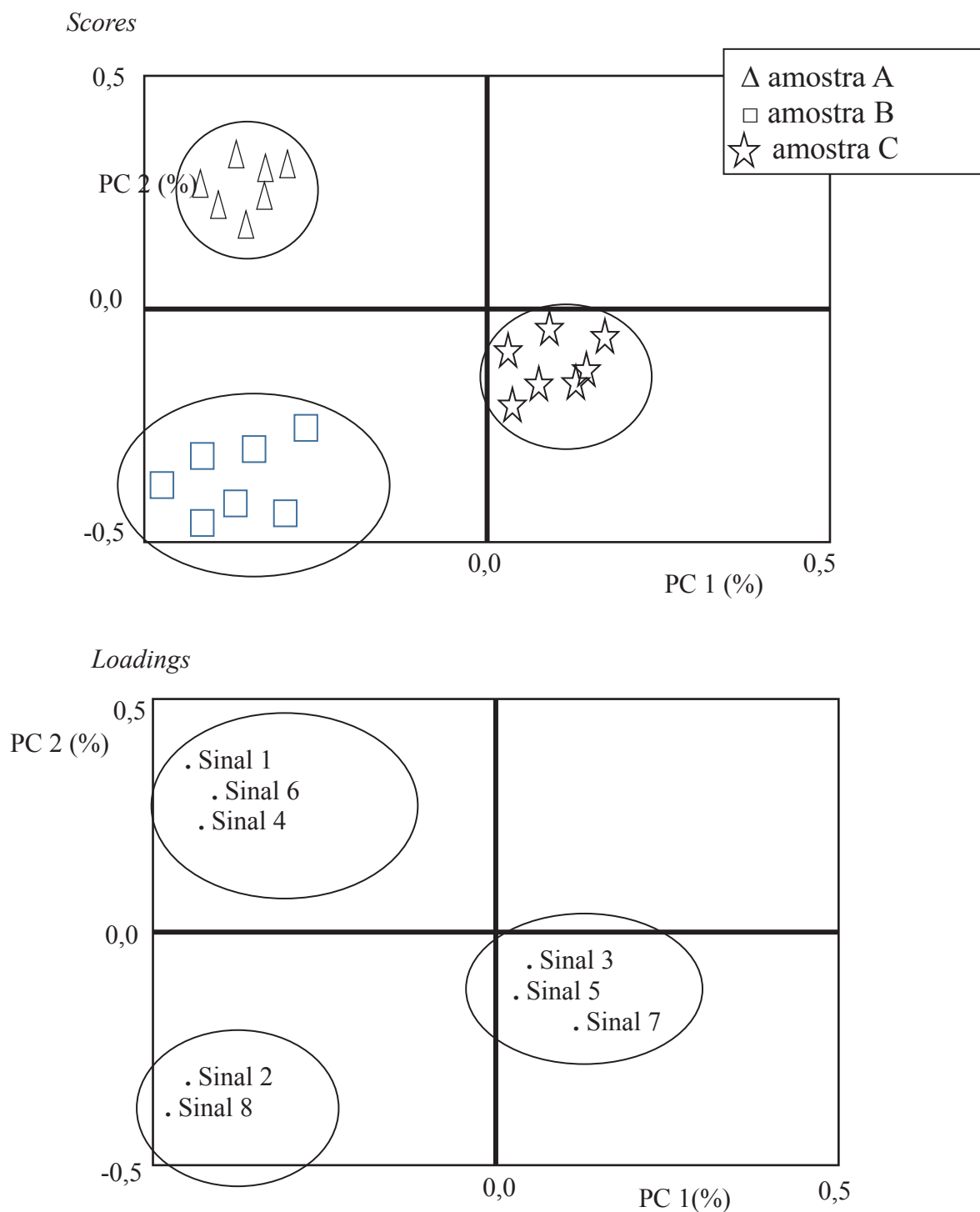


Figura 13: Representação esquemática dos gráficos de *scores* e *loadings*.

Ao aplicar a dados espectrais de RMN proveniente de amostras complexas, com alto grau de similaridade e grande número de variáveis, a análise de componentes principais resalta diferenças sutis entre o conjunto de amostras e as agrupa por grau de similaridade (Kumar *et al.*, 2014).

A alta dimensionalidade dos espectros de RMN é gerada através dos vários pontos adquiridos (espectros adquiridos com 64.000 pontos, cada ponto equivale a uma variável), desta maneira para estes dados se faz necessária a aplicação de ferramentas que possibilitem a interpretação correta de cada sinal.

Existem *softwares* específicos para este tipo de análise, onde o espectro é subdividido em *buckets* (conjunto de pontos), visto que um sinal é dado por uma determinada largura, que determina o tamanho dos *buckets* (Figura 14). Desta maneira se faz necessária a determinação do tamanho *bucket* através de observação do espectro, sinais mais alargados necessitam de *buckets* maiores para evitar a divisão de sinais, enquanto um espectro com sinais mais finos, os *buckets* devem ser menores para evitar o agrupamento de sinais.

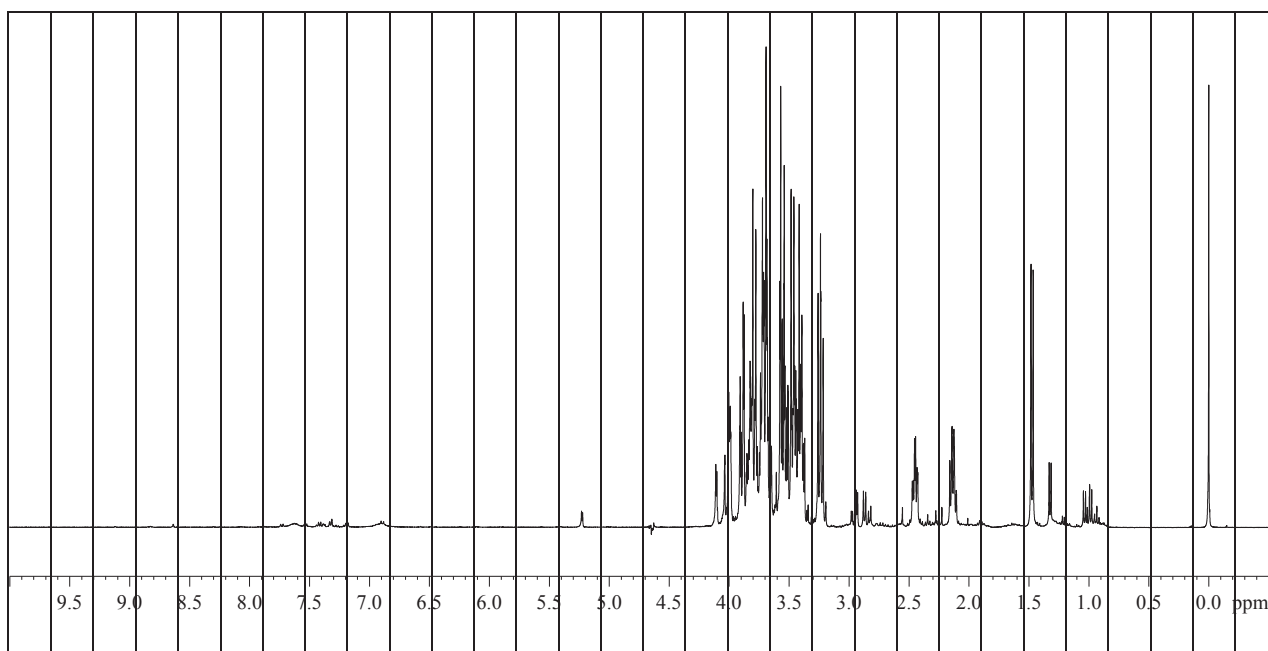


Figura 14: Representação esquemática do agrupamento em buckets de um espectro de RMN HR-MAS de ^1H de amostra de morango.

Além desta ferramenta é necessário também o pré-processamento de dados com objetivo de adequar o conjunto de maneira a maximizar ou minimizar o efeito de certas variáveis. Assim os pré-processamentos podem ter diversas finalidades. Transformações e pré-processamentos mais utilizados são: a) alisamento, diminui problemas de ruído; b) derivação, corrige problemas de deslocamento e inclinação de linha de base; c) logaritmo, compensa diferenças de sensibilidade; d) dados centrados na

média, diminui diferenças de linha de base; e) auto-escalamento, é realizado centrando os dados na média e posterior escalamento pela variância, deste modo se dá a mesma significância para todo o conjunto, entretanto pode aumentar o ruído.

Finalmente, o uso da PCA em dados espectroscópicos de estudos metabolômicos em frutas possibilita a caracterização de possíveis biomarcadores envolvidos em cada período de desenvolvimento e maturação (Cho *et al.*, 2007).

2. Objetivos

Geral

Investigar as alterações ocorridas no perfil químico do morango durante o desenvolvimento e maturação bem como a influência de diferentes tratamentos hormonais por técnica de RMN HR-MAS.

Específicos

- ✓ Determinar os melhores parâmetros de aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H .
- ✓ Caracterizar metabólitos do morango através de técnica de RMN HR-MAS.
- ✓ Determinar as alterações naturais ocorridas no perfil químico nos estádios de maturação de amostras sem tratamento, e em função de diferentes tratamentos hormonais através da RMN HR-MAS.
- ✓ Identificar nos espectros de RMN os principais metabólitos envolvidos no desenvolvimento e maturação através de análise multivariada.
- ✓ Caracterizar o perfil físico-químico e identificar possíveis alterações causadas por tratamentos hormonais nas amostras de morango.

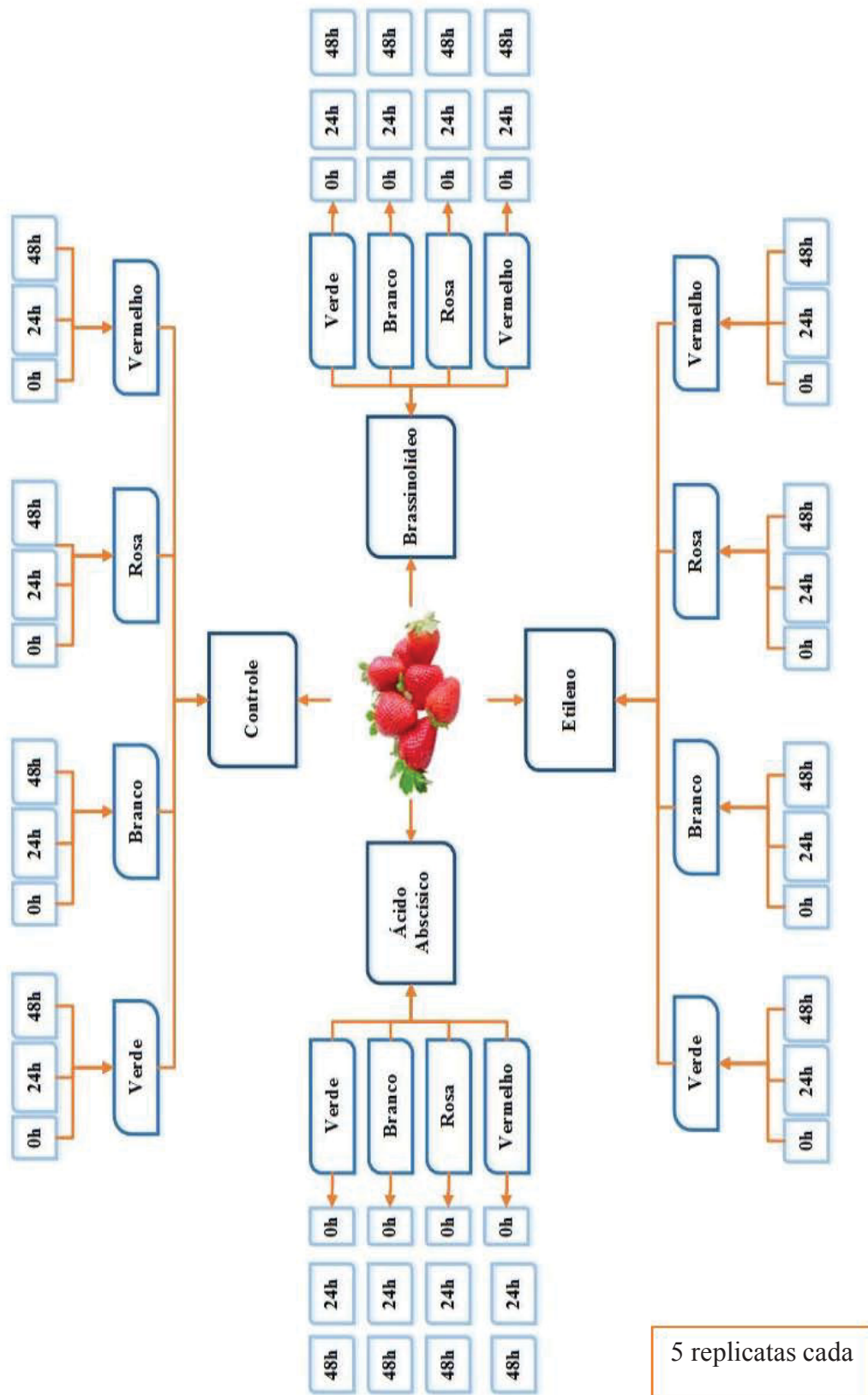
3. Experimental

3.1 Amostras

Os frutos de morango do cultivar Camiño Real foram obtidos de um pomar comercial (passou por tratamentos convencionais para o tipo de plantio, como herbicidas e pesticidas) em Ponta Grossa, Paraná (Latitude 24° 59.082' S, Longitude 50° 15.903' W e altitude 912 m) no período de novembro a dezembro de 2011.

Os morangos nos estádios de maturação verde, branco, rosa e vermelho foram submetidos a tratamento com diferentes fitormônios sem a remoção dos frutos da planta. Para isso, 0,5 mL de soluções etanólicas a 2% de 3-*epi*-brassinolídeo (brassinolídeo) 10 µM; etileno 2 mM (ETHEFON®, princípio ativo: ácido 2-cloroetilfosfórico, 72% m/v); ácido abscísico (ABA) 1 mM e água destilada e etanol 2% (solução controle) foram injetadas na parte inferior dos frutos com auxílio de uma seringa. Imediatamente após a aplicação dos fitormônios e decorridos os tempos 24 e 48 h as amostras foram coletadas em quintuplicatas e armazenadas a -80 °C para posterior análise por RMN HR-MAS (Figura 15).

Figura 15: Esquema de tratamento e amostragem do morango.



3.2 RMN HR-MAS

Os espectros de RMN HR-MAS de ^1H e experimento de correlação ^1H - ^1H foram adquiridos a 283 K em um espectrômetro Bruker AVANCE 400, operando a 9,4 Tesla, observando o núcleo de ^1H a 400,13 MHz, equipado com sonda HR-MAS de 4 mm, com gradiente de campo na direção do ângulo mágico. Para isso, fragmentos de 26,5 - 27,0 mg de morango foram extraídos com um coletor de amostras de tecidos e inseridos no rotor (porta amostra). Em seguida foi adicionada, com auxílio de uma seringa, uma solução de D_2O contendo 0,1% de $\text{TMS-}d_4$ e tampão fosfato de pH 6,7, até completar todo o volume do rotor. Posteriormente, a amostra foi homogeneizada dentro do próprio rotor, utilizando-se a seringa. O rotor foi montado com espaçador superior, parafuso e, finalmente a turbina responsável por girá-lo no ângulo mágico ($54,74^\circ$). Nesta etapa, três diferentes procedimentos de preparo de amostra foram avaliados: retirada de amostra da região central com auxílio de *punch* (equipamento cirúrgico para retirada de tecido); fruta triturada com auxílio de nitrogênio líquido, sem o ápice e, fruta triturada com N_2 líquido sem ápice e casca. Foram testadas três sequências de pulsos que para a saturação dos sinais dos hidrogênios de água, variando parâmetros específicos em cada sequência, mantendo apenas número de transientes 128; RG de 10.1 e TD de 64K pontos. Sequência ZGPR; NOESYPR1D, variando d_1 de 1 a 4 s e d_8 de 50, 100 e 150 ms; excitação esculpida, variando p_{12} de 1 a 4 ms. Utilizando a sequência de pulsos otimizada foram obtidos espectros com número de transientes de 256, 512 e 1K. Com os parâmetros anteriormente otimizados foram obtidos espectros variando a velocidade de giro de 3000 a 6000 Hz, com incremento de 500 Hz. Para elucidação foram utilizados dados da literatura e adição de padrão (MERCK®) para caracterização de asparagina.

3.3 Análise Quimiométrica

Os espectros de RMN HR-MAS de ^1H adquiridos das amostras de morango foram submetidos à análise quimiométrica pelo método de análise por componentes principais (PCA) com auxílio do programa computacional AMIX®, desenvolvido especialmente para realizar análises multivariadas de dados de RMN. Desta forma, os espectros foram divididos em pequenos intervalos (*buckets*) de 0,05 ppm cada entre a região 0,5 a 8,0 ppm, com exceção da região entre 4,5 a 5,5 ppm relativa aos resíduos de sinais da saturação da água. Em seguida, foi determinada a área de cada *bucket* pelo método

utilizando de integração pela soma das intensidades absolutas e escalados em relação à intensidade total dos sinais.

3.4 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas utilizando-se toda a fruta, exceto o ápice. Para tais análises, as amostras foram lavadas em água corrente, trituradas em processador de frutas doméstico (mixer Philipps/Walita, RI1366), e armazenadas em potes de vidro, tampados com papel filme, sob refrigeração de 4°C até a realização dos experimentos.

Determinação de índice de firmeza: A firmeza da polpa foi determinada em triplicata para cada estágio de amadurecimento e tratamento com os fitormônios com o auxílio de um penetrômetro (modelo DD-200; marca INSTRUTHERM), com ponteira de 6 mm, na região equatorial da fruta. Os resultados médios das amostras foram expressos em Newton (N).

Determinação do pH: O pH foi determinado em pHmetro (marca Quimis, eletrodo de vidro com referência interna Ag/AgCl; calibrado com solução tampão pH 4 e 7), realizando-se a leitura direta na polpa de morango logo após seu processamento.

Determinação de teor de sólidos solúveis totais (% SST) ou °Brix: Para isso, foram utilizados aproximadamente 0,3 g da polpa de morango sobre o prisma do refratômetro manual (marca Quimis; modelo Q767; faixa 0-32%; precisão de 0,2 °Brix). As leituras foram realizadas em triplicatas, à temperatura ambiente (21 – 23°C).

Determinação do índice de acidez (g de ácido cítrico por 100 g de fruta): O procedimento constituiu-se em adicionar 10 g de polpa de frutos de morango em 100 mL de água destilada, acrescentando-se três gotas de fenolftaleína a 1% em etanol (pH 8,0 - 9,8). Posteriormente, a titulação foi realizada com a solução de NaOH 0,1 M, (padronizada com o padrão primário ftalato ácido de potássio) até o ponto de viragem (incolor – vermelho).

Determinação de teor de açúcares totais (Método Fenol-Sulfúrico): Para isso, adicionou-se 10 g de polpa de frutos de morango em 100 mL de água destilada que foram armazenadas por 24 horas para a extração dos açúcares a 4 °C. Em tubos de ensaio foram adicionados 0,5 mL da amostra diluída, 0,5 mL de solução de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, seguido de repouso por 10 min, em ausência de luz. As leituras foram realizadas em triplicatas com cubetas de quartzo no

espectrofotômetro Shimadzu 1650PC em 490 nm. Os resultados foram comparados com uma curva de calibração construída tendo como padrão a glicose.

Determinação de teor de ácido ascórbico: Essa medida foi realizada pelo método de Tillmans, em que 10 g de polpa da fruta foi adicionada em 100 mL de solução de ácido oxálico 0,4%. Desta solução, foram utilizados 2 mL diluídos com 25 mL de água destilada que foi titulada com o reativo de Tillmans – DCFI (2,6-diclorofenolindofenol). Esses resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico / 100 g de polpa de fruta (AOAC, 2002).

Determinação de teor de fenólicos: O teor de compostos fenólicos foi determinado através da leitura da absorbância em 720 nm em um espectrofotômetro Shimadzu 1650PC de acordo com o método de Folin-Ciocalteu. Para isso, 10 g de polpa foram adicionadas em 50 mL da solução extratora (álcool 70 %, água destilada; ácido fórmico 3% nas proporções 80:20:1 v/v respectivamente). As amostras foram armazenadas por 20 horas a -18 °C e centrifugadas por 60 s. Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,1 mL da amostra, 8,4 mL de água destilada, 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 1,0 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 21%. Os tubos foram agitados e deixados em repouso por uma 1 h e em seguida foram realizadas as leituras em triplicatas com cubetas de quartzo no espectrofotômetro Shimadzu 1650PC. Os resultados são expressos em mg de ácido gálico (GAE) / 100 g de polpa. Os resultados foram comparados com uma curva de calibração construída tendo como padrão o ácido gálico.

Determinação de teor de antocianinas: O teor de antocianinas foi determinado pelo método de diferencial de pH entre os comprimentos de onda 520 e 700 nm utilizando o espectrofotômetro Shimadzu 1650PC. Para isso, 10 g de polpa foram adicionadas em 25 mL de solução extratora de etanol absoluto acidificado em HCl 1,5 M (85:15 v/v). As amostras foram armazenadas no escuro por 20 horas a temperatura ambiente. Os extratos obtidos foram diluídos utilizando-se soluções tampão de cloreto de potássio (pH 1,0) e acetato de sódio (pH 4,5) até apresentarem absorbâncias entre 0,8 e 1,2 nos comprimentos de onda de 520 e 700 nm. Os resultados são expressos em mg cianidina-3-glicosídeo/ 100 g de polpa. Os resultados foram comparados com uma curva de calibração construída tendo como padrão a cianidina-3-glicosídeo.

3.5. Testes estatísticos

Foram realizados testes t, a fim de comparar as médias dentro de cada tratamento. Foi utilizado programa Assistat, versão 7.7 beta, para análise de variância ANOVA, experimentos em blocos com repetições e nível de 5% de probabilidade.

4 Resultados e Discussões

4.1 Determinação dos parâmetros de aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H

As amostras de frutas possuem naturalmente grande quantidade de água, resultando em um sinal muito intenso nos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , o qual se sobrepõe aos sinais menos intensos. Portanto, foi necessário o uso de uma sequência de pulsos para suprimir o sinal da água dos espectros.

Deste modo, foram avaliadas três sequências de pulsos: ZGPR, NOESYPR1D e excitação esculpida no intuito de verificar qual seria mais eficiente na saturação dos sinais da água. Nestes ensaios foram mantidos constantes o RG (10.1), bem como número de promediações (128), janela espectral (20,054 ppm), massa de amostra (26,5 - 27,0 mg) e temperatura de 283 K. A manutenção da temperatura evitou a degradação da amostra, e o uso de temperaturas menores poderiam congelar a mesma, visto que a natureza da amostra contém grande quantidade de água, diminuindo a mobilidade das moléculas ocasionando alargamento de sinais. Além disto, as amostras foram preparadas a partir da mesma fruta e empacotadas imediatamente antes de cada experimento para evitar a degradação da amostra dentro do rotor durante o tempo de aquisição.

A sequência de pulso ZGPR é uma sequência com saturação do sinal da água mais simples utilizada neste trabalho, envolvendo apenas um pulso seletivo de baixa potência na frequência de ressonância dos hidrogênios da água durante o tempo de recuperação (d1). Aplicação desta sequência foi muito eficiente na eliminação do sinal da água e resultou em apenas um sinal residual em 4,9 ppm (Figura 16). Neste experimento o d1 foi mantido constante (1s). Desta forma, foi possível observar os sinais de menor intensidade, principalmente na região de ácidos orgânicos e aminoácidos (1,00 a 3,00 ppm, Figura 16).

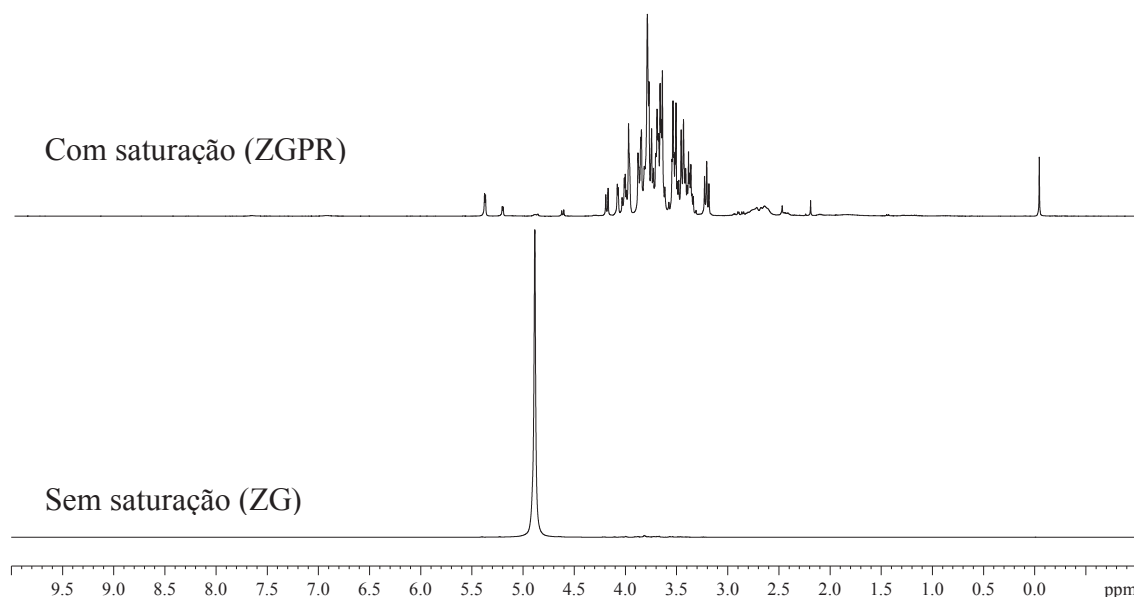


Figura 16: Comparação entre espectros de RMN HR-MAS de ^1H adquiridos com e sem saturação do sinal da água.

A sequência de pulsos NOESYPR1D suprime o sinal da água pela aplicação de um pulso seletivo de baixa potência na frequência de ressonância dos hidrogênios da água durante o tempo de recuperação (d1), da mesma forma que a sequência ZGPR, mas também pela aplicação adicional de um novo pulso seletivo de baixa potência também durante o tempo de mistura (d8). Neste caso, foi necessário avaliar quais os melhores tempos de mistura e recuperação que resultariam na melhor supressão do sinal da água. Foram avaliados os tempos de mistura (d8) de 50, 100 e 150 ms e de recuperação (d1) de 1 a 4 s. A combinação que resultou na melhor supressão do sinal da água foi tempo de mistura de 50 ms e d1 de 1s (Figura 17). Além disto, esta combinação é muito interessante, pois resulta em menor tempo de aquisição, o que evita degradação da amostra e otimiza tempo de aquisição.

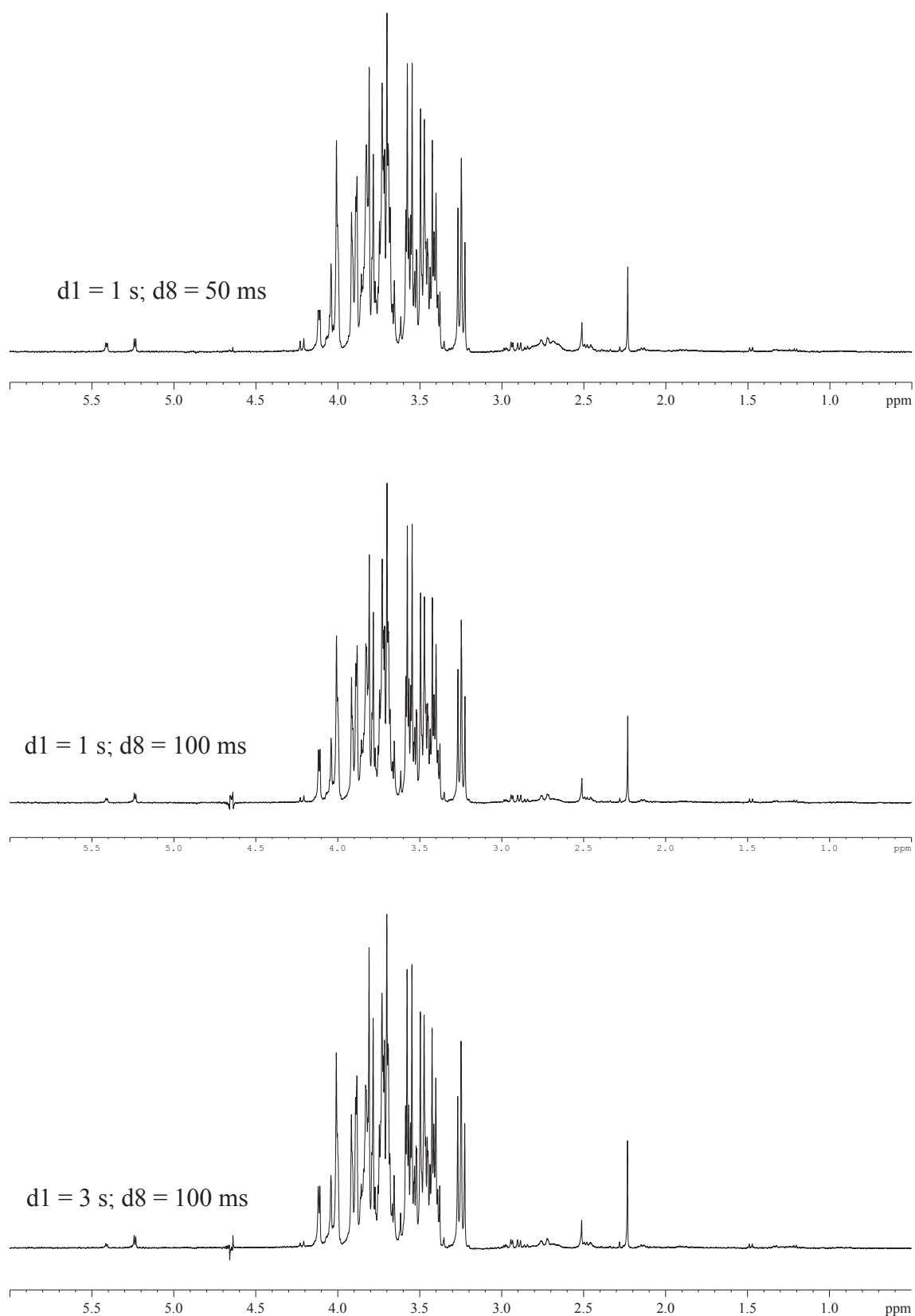


Figura 17: Espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos com a sequência NOESYPR1D com diferentes combinações de tempo de recuperação e mistura.

Essa sequência tem sido amplamente empregada na literatura, principalmente para aquisição de espectros de amostras biológicas, tais como tecidos vegetais, pois é mais eficiente que a sequência ZGPR na saturação do sinal de hidrogênios da água. Por exemplo, ela foi utilizada por Ritota e colaboradores (2012) na aquisição de espectros de RMN HR-MAS de ^1H para identificar diversos metabólitos da carne de búfalo. Foi observada a perturbação dos sinais dos hidrogênios vizinhos à região de saturação causados por esta sequência de pulsos, principalmente nas intensidades dos sinais em 4,63 e 5,20 ppm. Desta forma, sinais próximos à região de saturação não poderiam ser utilizados na análise multivariada.

Além disso, Ritota e colaboradores (2010) identificaram uma série de metabólitos na pimenta doce com a técnica de HR-MAS de ^1H utilizando essa sequência. Por meio da técnica de PLS-DA foi possível diferenciar as amostras de acordo com regiões de plantio. No entanto, os autores utilizaram uma região de exclusão maior ao redor do sinal da água evitando assim, a utilização de sinais afetados pela saturação dos hidrogênios da água.

Pérez e colaboradores (2011) identificaram metabólitos responsáveis pelo “flavor” (interação entre substâncias responsáveis pelo aroma e sabor) de tomates produzidos na Espanha, através de espectros de RMN HR-MAS de ^1H do purê de tomate, utilizando a sequência de pulsos NOESYPR1D. Com auxílio da análise de componentes principais identificaram como marcador de maturação o ácido γ -aminobutírico (GABA) além dos compostos frutose, glicose e ácido cítrico como responsáveis pela diferenciação de variedades.

Tais estudos indicaram que a sequência NOESYPR1D é uma alternativa eficiente na aquisição de espectros RMN de ^1H de amostras com alto conteúdo de água. Porém, alguns cuidados devem ser observados na interpretação dos sinais próximos a região de saturação, visto que, os sinais vizinhos também podem ser afetados.

Neste trabalho, verificou-se que a aplicação desta sequência de pulsos perturbou os sinais vizinhos, principalmente do hidrogênio anomérico da β -glicose (4,63 ppm), enquanto que utilizando a sequência ZGPR não houve a perturbação dos sinais vizinhos (Figura 18).

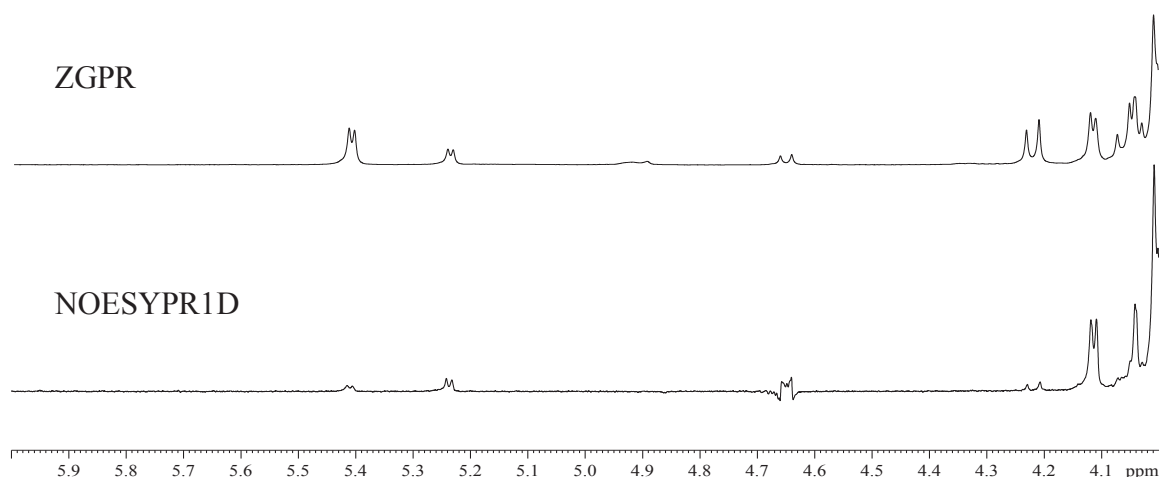


Figura 18: Sobreposição das ampliações dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos com as sequências ZGPR e NOESYPR1D.

Testes preliminares realizados a partir de 2013 não se observou a interferência nos sinais adjacentes aos dos hidrogênios da água. Ao observar a figura 19 o sinal residual dos hidrogênios da água ele aparece simétrico e não influenciou sinais de açúcares vizinhos a ele. No entanto o surgimento da perturbação dos hidrogênios vizinhos foi constatado após o início da análise das amostras reais (Figura 19). Esta interferência pode ser evitada com retirada a região entre 4,4 – 5,1 ppm na análise de componentes principais, não comprometendo tais resultados. Para caracterização dos sinais da β -glicose foi utilizado sinal em 3,23 ppm (referente ao hidrogênio 2).

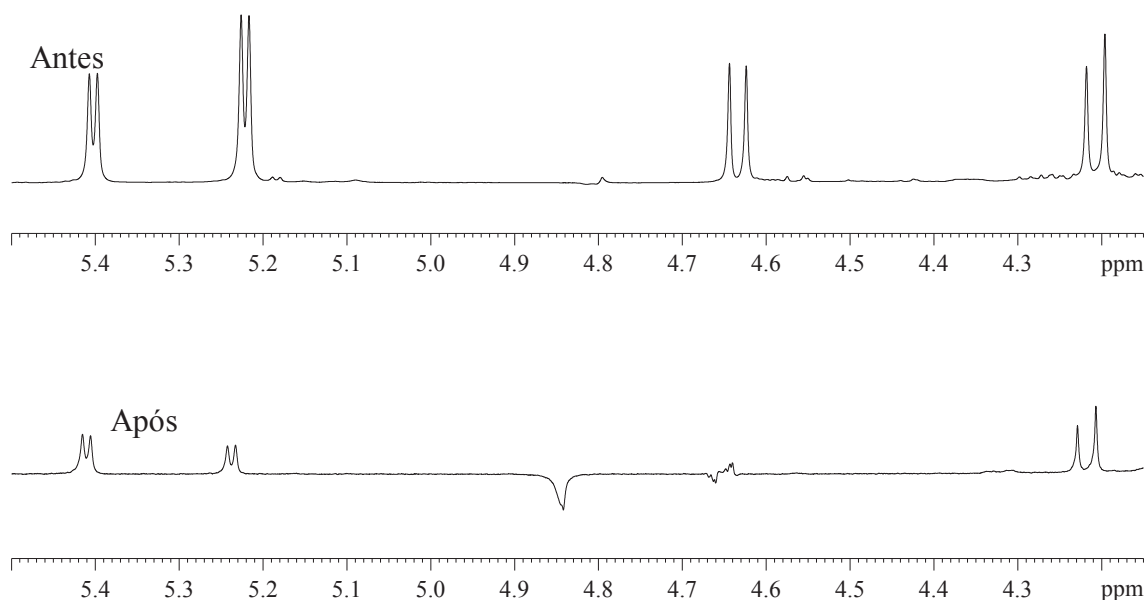


Figura 19: Espectros de RMN HR-MAS de ^1H adquiridos antes e após o problema de saturação do sinal.

A sequência de excitação esculpida envolve aplicação de pulsos formatados para saturação do sinal água. Dessa forma, foi avaliado o tempo de duração do pulso formatado (p12) variando de 1 a 4 ms. A melhor saturação foi obtida com a aplicação de um pulso formatado de 3 ms (Figura 20) porém, observou-se um sinal residual dos hidrogênios da água em 4,89 ppm. Portanto, a referida sequência de pulsos não é eficiente para eliminar o sinal da água na matriz avaliada.

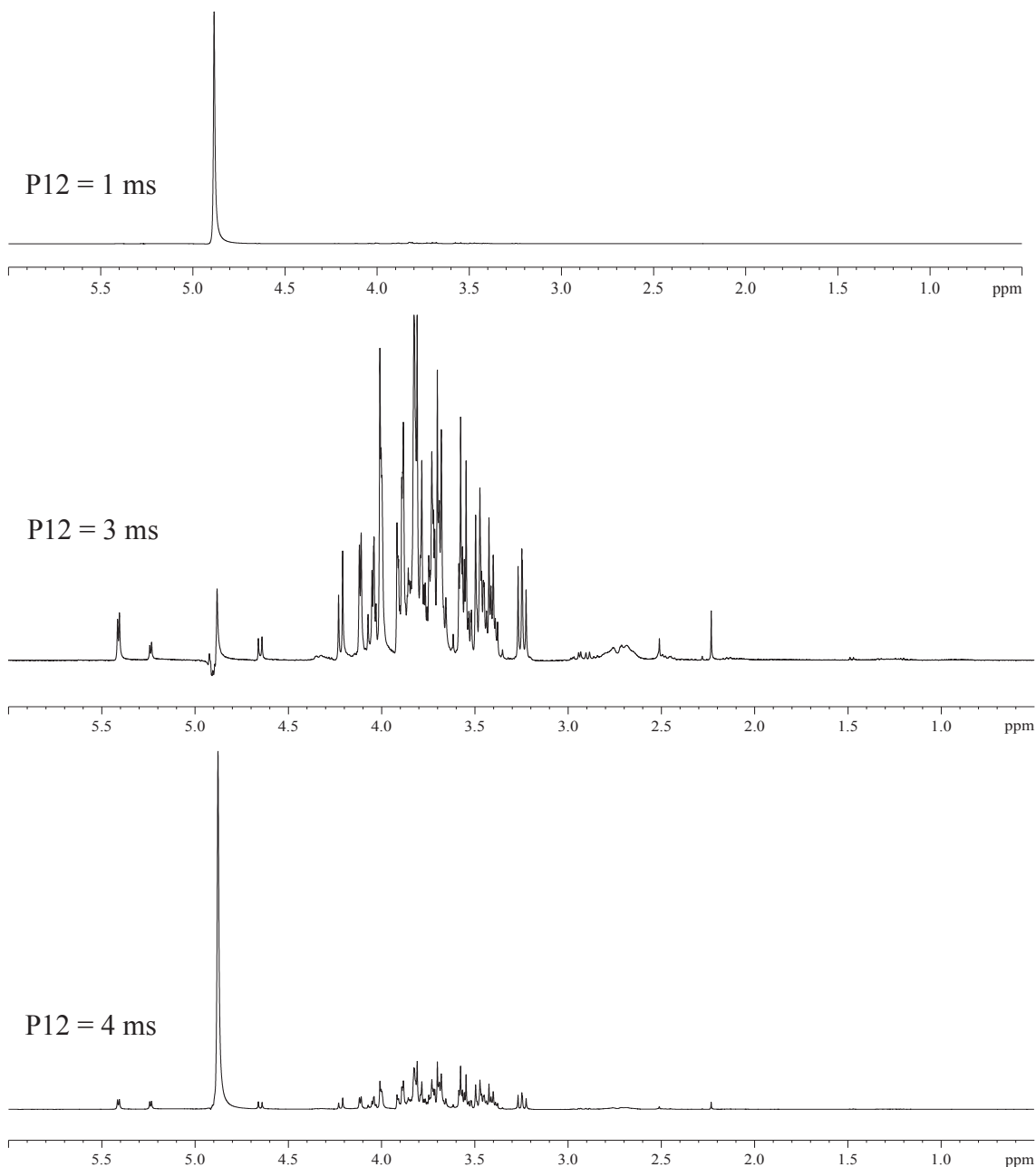


Figura 20: Espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos com a sequência de excitação esculpida.

Entre as três sequências de pulsos avaliadas pôde-se observar que a sequência de pulso ZGPR e NOESYPR1D foram as mais eficientes na saturação do sinal da água

(Figura 21). Além disso, a sequência ZGPR não perturbou os sinais vizinhos logo, se mostrou a mais adequada para aquisição de RMN HR-MAS de ^1H de morango.

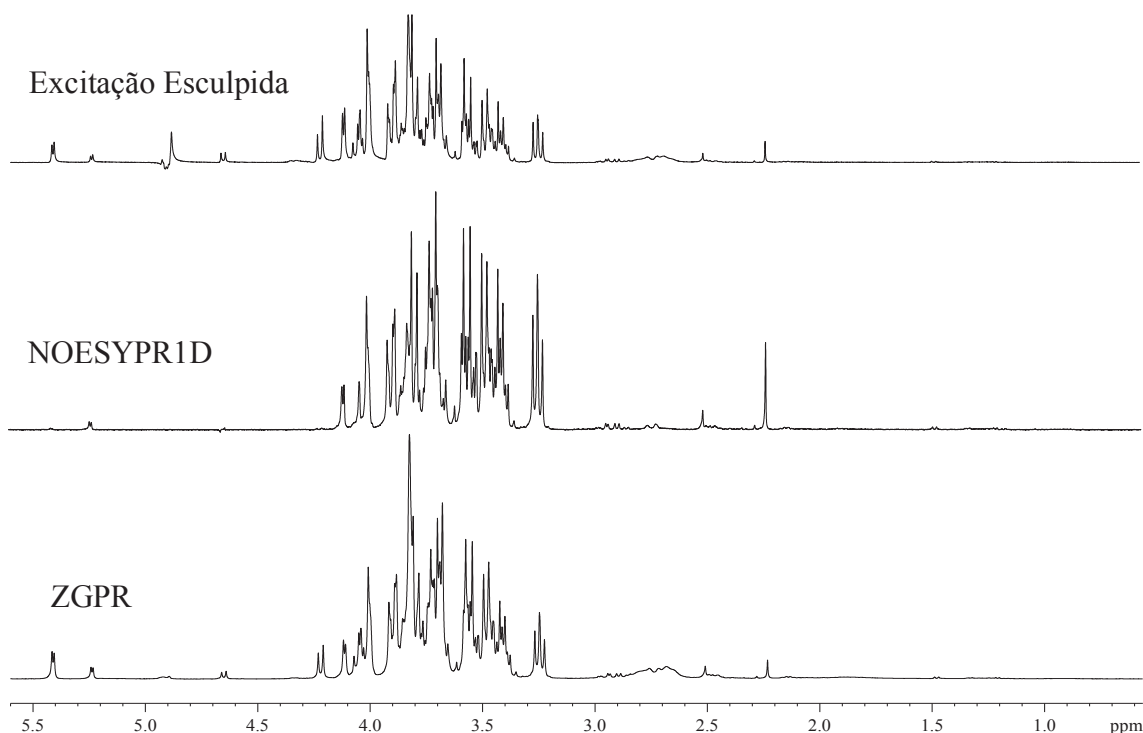


Figura 21: Espectros de RMN HR-MAS de ^1H adquiridos com as sequências de pulso otimizadas.

A partir de cada sequência otimizada foram adquiridos espectros de RMN HR-MAS de ^1H em triplicatas a fim de se observar a reprodutibilidade dos espectros.

Ando e colaboradores (2010) relataram que o TMSP pode ser adsorvido a proteínas, que alarga o sinal e reduz sua intensidade. Seu grau de adsorção depende da composição da macromolécula, o que justifica a variação na intensidade, tal variação também interfere na calibração dos sinais, que deve ser feito com outro sinal presente nas amostras, e que não sofra alterações de deslocamento químico durante a aquisição dos espectros. Portanto, neste trabalho foi utilizado na comparação dos espectros, o sinal em 3,23 ppm referente ao hidrogênio da β -glicose (del Campo, 2006).

Em cada triplicata (em todas as sequências foram reempacotadas) um dos espectros não se sobrepôs, independente da sequência utilizada (Figura 22).

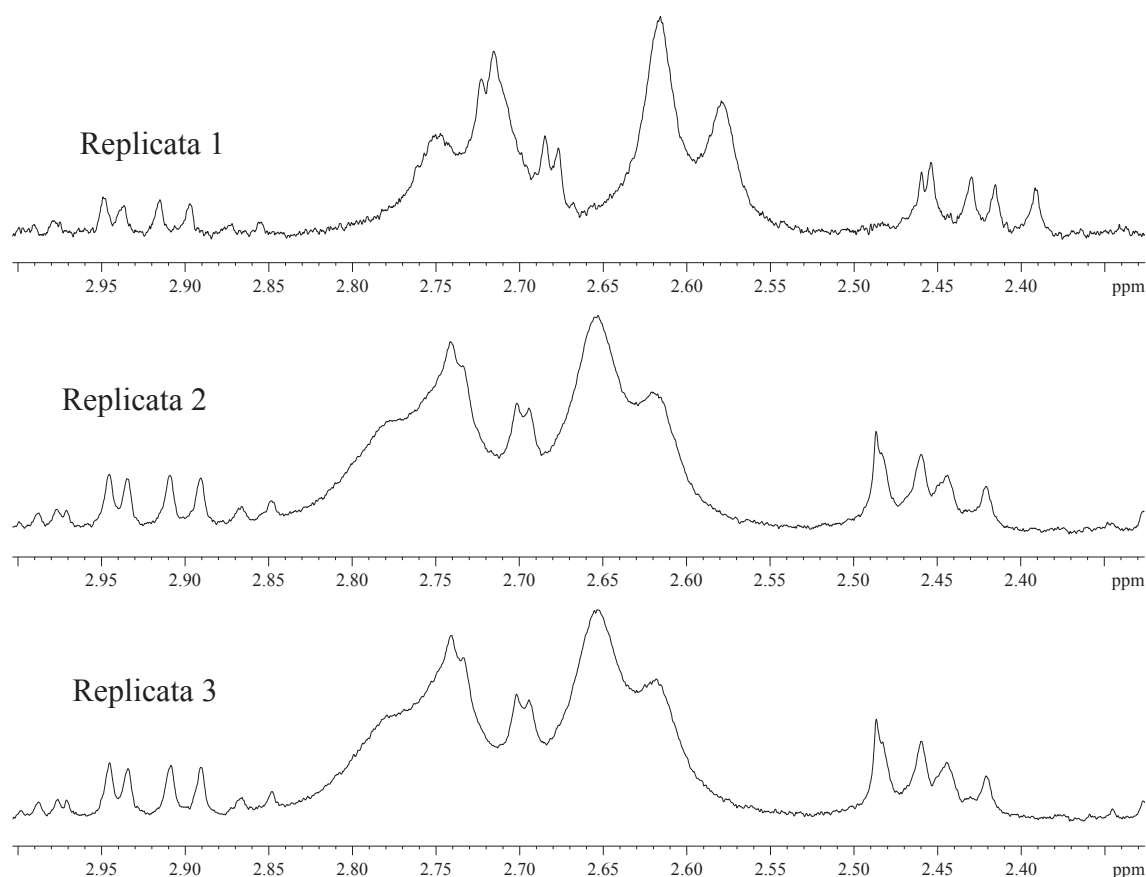


Figura 22: Sobreposição de espectros de RMN HR-MAS de ^1H ampliados obtidos com a sequência ZGPR otimizada.

No entanto, comparando-se os espectros que não se sobrepuseram com os espectros obtidos de todo morango exceto ápice (como pode-se observar na Figura 22, e será discutido no próximo item com maior clareza), bem como, do espectro apenas da semente, pôde-se concluir que os sinais não sobreponíveis eram dos compostos presentes nas sementes.

4.2 Preparo de amostra

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras de frutas são bastante dependentes das mudanças de pH (del Campo *et al.*, 2006), mesmo se tratando da mesma espécie, cultivar e área da cultivo, causando assim alterações no deslocamento químico dos hidrogênios de alguns compostos, principalmente de ácidos orgânicos.

Nos espectros de RMN HR-MAS de ^1H dos testes iniciais, adquiridos sem a adição de tampão, foram observados desvios nos deslocamentos químicos principalmente na região de 2,57 – 2,98 ppm, característica de ácidos cítrico e málico,

fato devido a alterações do pH. Para evitar alterações nos deslocamentos químicos, uma solução de tampão fosfato de pH 6,7 (Iglesias *et al.*, 2014; Ritota *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2010), foi preparada em água deuterada, sendo refeitos os testes já realizados, desta maneira todos os resultados finais da otimização dos parâmetros foram obtidos através de espectros obtidos com a utilização do tampão. A adição do tampão fosfato acrescentou um sinal em 2,21 ppm no espectro (Figura 23). Apesar disso, sua adição diminuiu as alterações nos deslocamentos químicos devido às variações de pH durante a aquisição dos espectros.

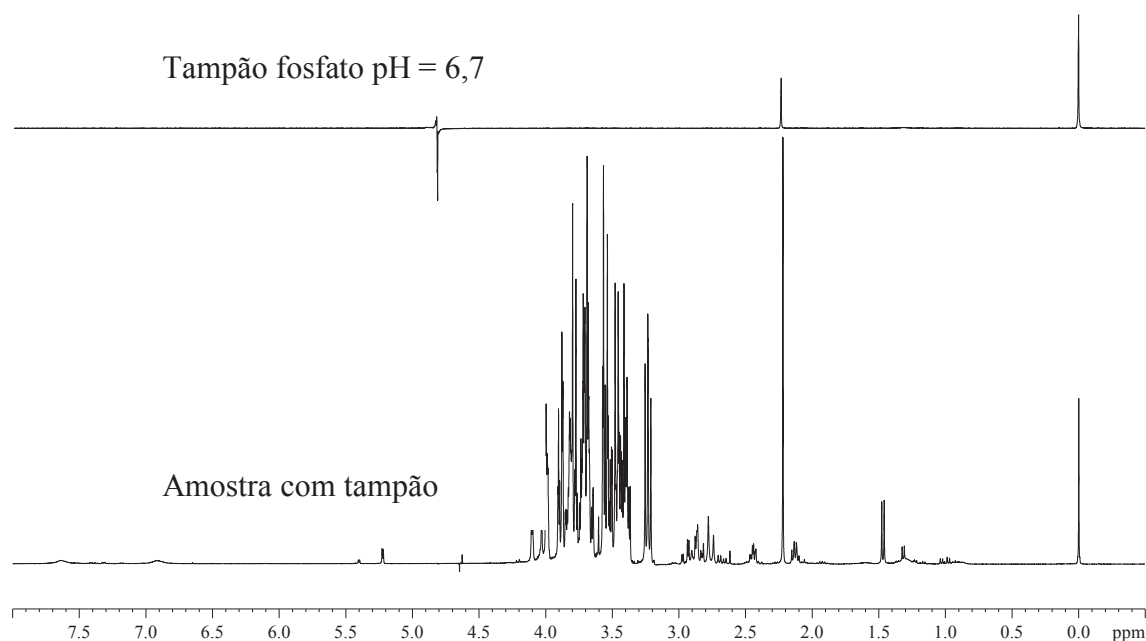


Figura 23: Espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos somente da solução tampão fosfato e da amostra com tampão.

Além disso, foram avaliados três diferentes procedimentos de amostragem. O primeiro teste consistiu em retirar uma pequena porção da região central do morango (Vermathen *et al.*, 2011) a fim de evitar problemas com homogeneidade da amostra. O morango foi cortado ao meio ainda congelado, retirando uma amostra da região central da polpa, utilizando um *punch* (trata-se de instrumento cirúrgico utilizado para retirada de amostra de tecido para biopsia) e inserido no rotor (Figura 24).

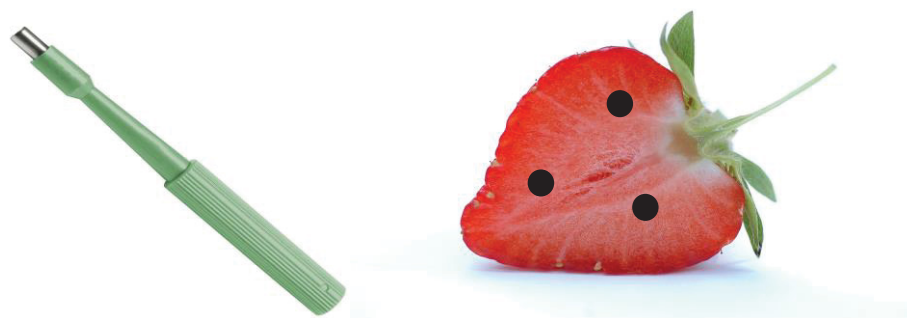


Figura 24: Esquema de retirada de amostra com *punch*.

Com a variação da posição de retirada de amostra, houve diferenças na composição química da fruta, principalmente na região de 2,00 a 3,00 ppm que apresenta sinais de alguns aminoácidos como glutamina e asparagina, e ácidos málico e cítrico. Tal observação se deve à distribuição não homogênea dos compostos na fruta (Figura 25).

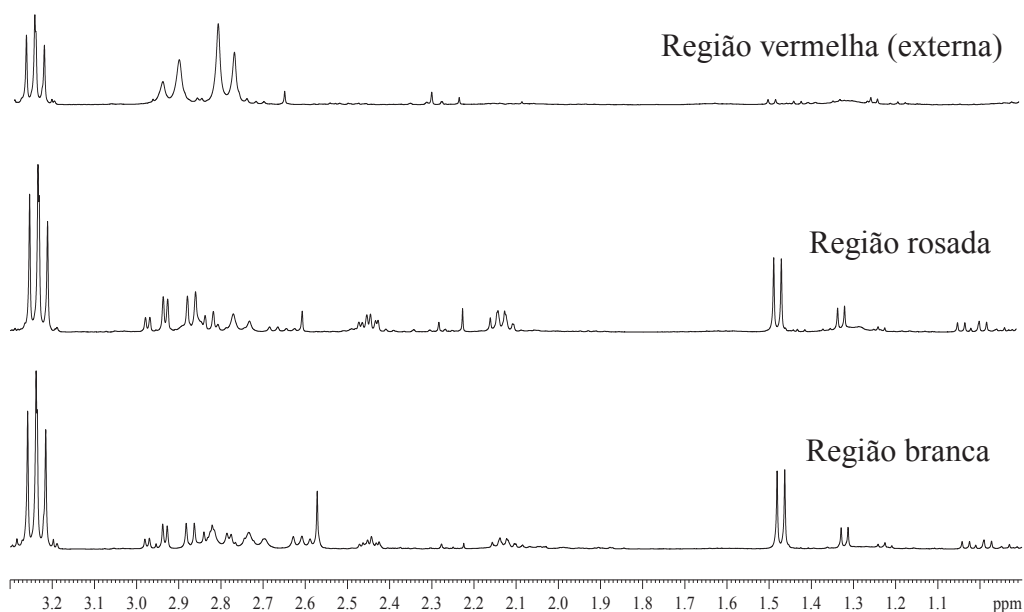


Figura 25: Expansão dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos de amostras retiradas de diferentes partes da fruta.

Dessa forma, no intuito de garantir maior representatividade da fruta, o morango inteiro, exceto o ápice, foi triturado com auxílio de nitrogênio líquido até a formação de uma mistura homogênea. Com este procedimento foi observado a não reprodutibilidade de um dos espectros, dentro da quintuplicata, o qual apresentou sinais alargados na

região de 0,8 a 3,0 ppm (Figura 26). A presença destes sinais alargados se deve à presença de sementes em algumas das amostras. Isto foi confirmado obtendo espectros de RMN HR-MAS de ^1H de amostra com adição de sementes (Figura 26).

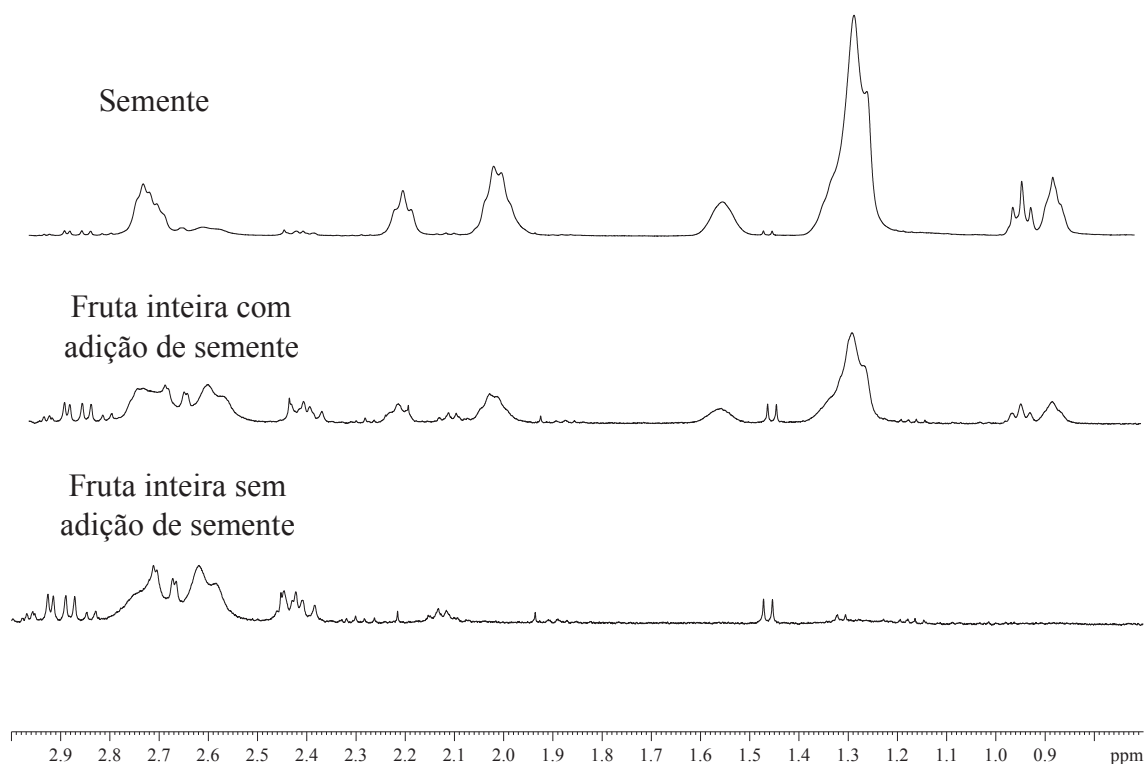


Figura 26: Ampliações dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos no teste com pool de amostra com e sem adição de semente.

Portanto, foi retirada a camada externa do morango descascando-o para eliminação das sementes, e em seguida, ele foi triturado com nitrogênio líquido formando uma mistura homogênea. Dessa forma, foi observada boa reprodutibilidade dos espectros. Logo, esta metodologia foi empregada para a obtenção dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H de morango.

4.3 Determinação do número de promediações

Uma vez tendo sido otimizadas as sequências de pulsos e preparo da amostra, foi então avaliado o número de promediações necessárias para uma boa relação sinal/ruído, principalmente dos sinais referentes aos possíveis compostos minoritários. Assim, os espectros de RMN HR-MAS de ^1H foram adquiridos com 256, 512 e 1024 promediações.

Os espectros obtidos com 256 e 512 promediações apresentaram relação sinal/ruído similares (Tabela 2). Por outro lado, aqueles adquiridos com 1024 promediações apresentaram melhor relação sinal/ruído, permitindo observar os sinais de metabólitos minoritários (Figura 27). Por exemplo, os sinais em 1,02; 1,91 e 2,31 ppm apresentaram melhor relação sinal/ruído, justificando assim, o uso de número de promediações de 1024, apesar do maior tempo de aquisição (Tabela 2).

Tabela 2: Tempo de aquisição e relação sinal/ruído em relação ao aumento do número de promediações.

Número de promediações	Relação sinal/ruído (Média)	Tempo de aquisição
256	131,12	21 min 51 s
512	169,47	43 min 42 s
1024	317,48	1 h 27 min 25 s

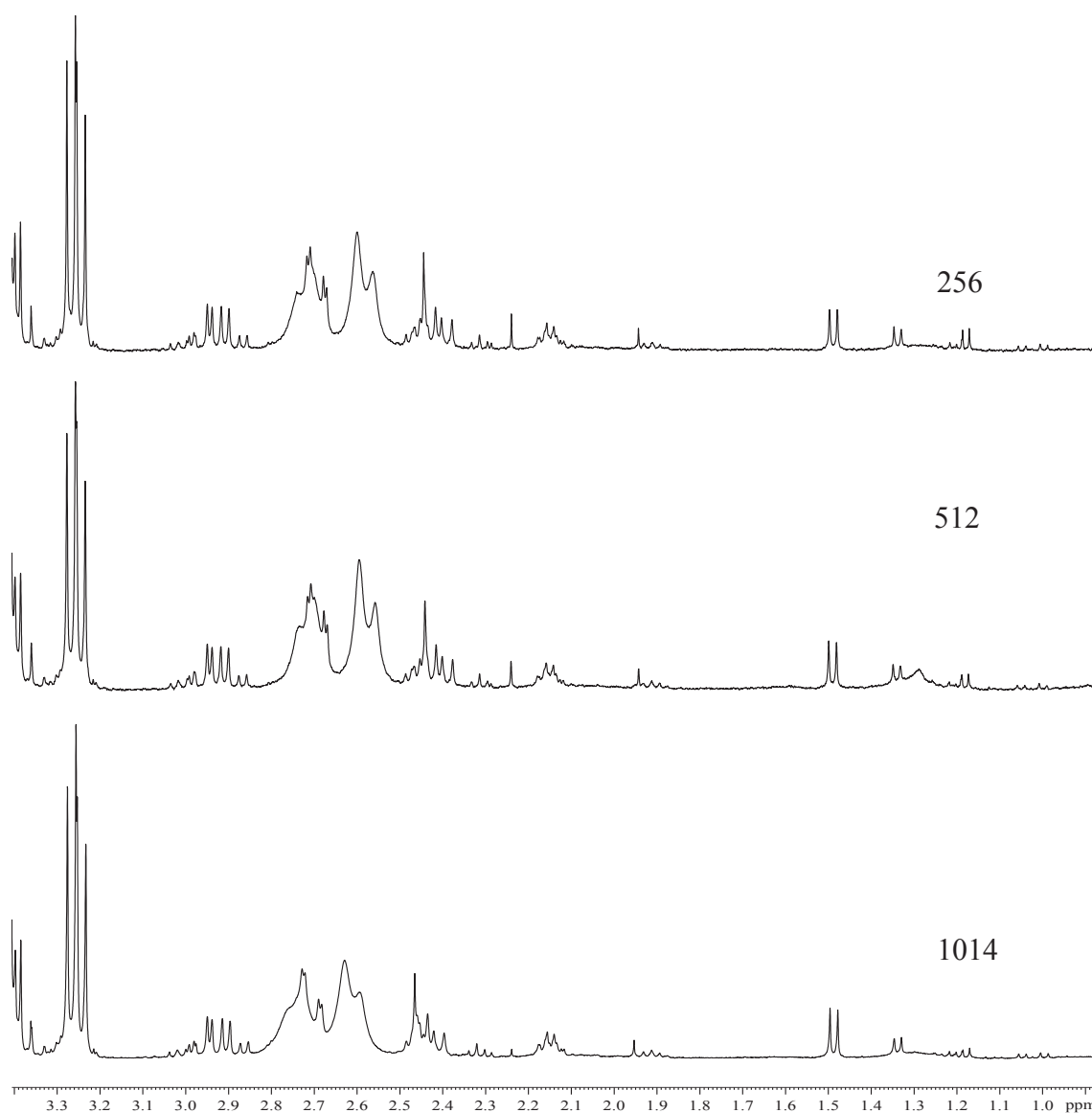


Figura 27: Sobreposição das ampliações dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos com diferentes números de promediações.

4.4 Avaliação do tamanho de rotor

Devido à existência de dois tamanhos de rotores, com capacidade de 12 e 50 μL (Figura 28) foi avaliado qual apresentaria melhor relação sinal/ruído atrelada à resolução espectral (Figura 29). Para isso, os espectros foram adquiridos em condições idênticas com a sequência ZGPR, com 128 promediações, em triplicatas.

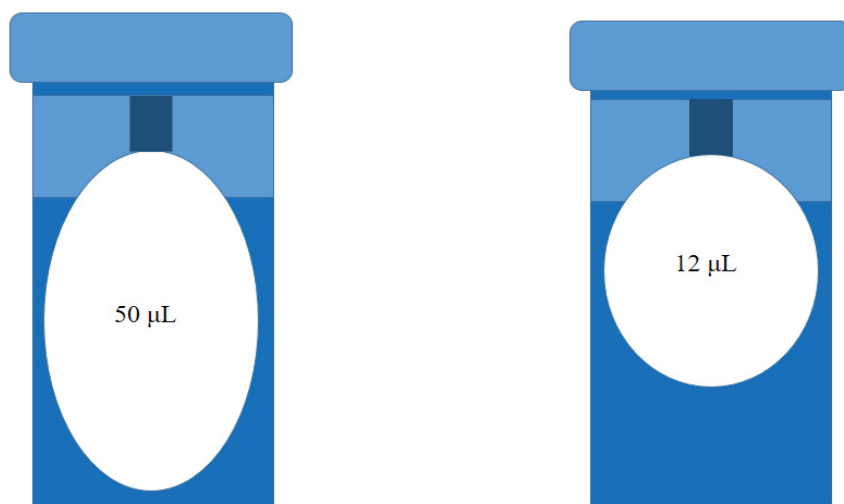


Figura 28: Ilustração dos volumes dos rotores.

O rotor de 12 μL comporta uma menor quantidade de amostra, porém tem como diferencial o formato esférico que possibilita maior homogeneidade da amostra o que teoricamente proporciona maior resolução espectral. Por outro lado, devido à pequena quantidade de amostra também há, menor relação sinal/ruído e, conseqüentemente é necessário maior acúmulo de promediações.

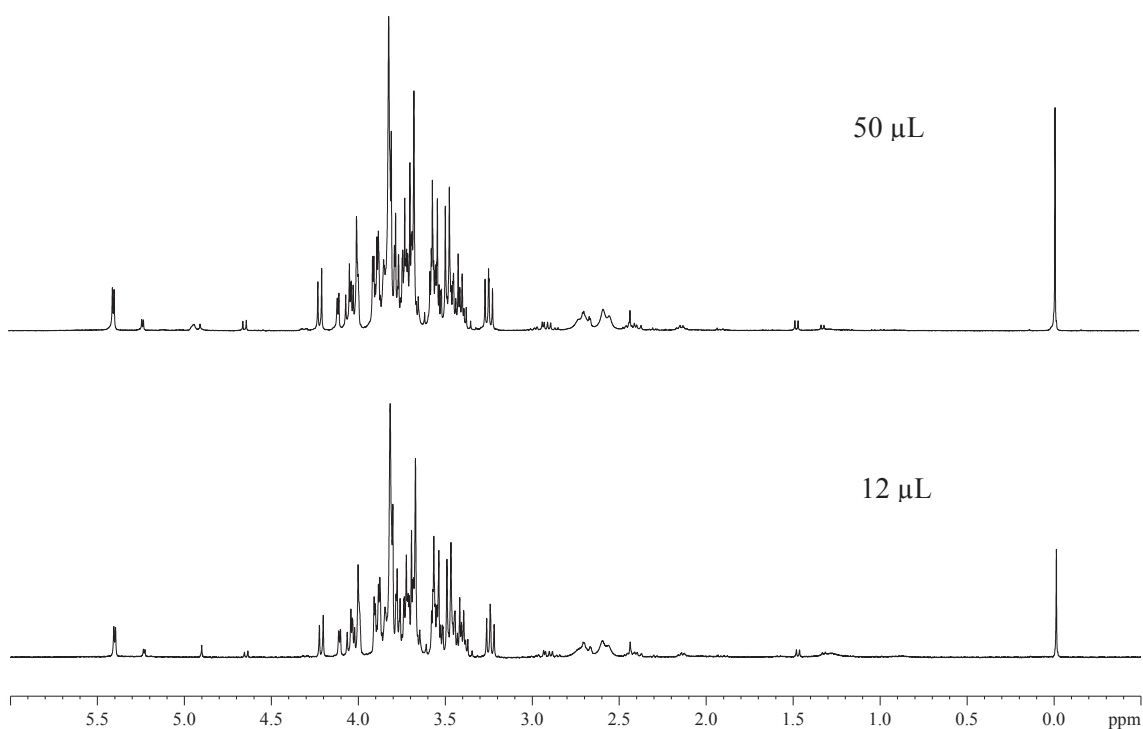


Figura 29: Comparação entre espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos com rotores de diferentes capacidades de amostra.

Entretanto, o rotor de 50 μL que teoricamente perderia resolução por dispor a amostra em formato cilíndrico, apresenta maior relação sinal/ruído devido à maior capacidade. Os espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos com ambos os tamanhos de rotores apresentaram resolução espectral bastante semelhante (Figura 29) e relação sinal/ruído maior para o rotor de 50 μL em relação ao de 12 μL (231,17 e 187,45, respectivamente). Portanto, foi utilizado o rotor de 50 μL por apresentar maior capacidade e, com isso, necessita um menor número de promediações para aquisição dos espectros da matriz em estudo.

4.5 Avaliação de estabilidade da amostra

O tempo de exposição da amostra ao ambiente pode causar a sua degradação devido à ação de enzimas liberadas durante o preparo da amostra, podendo ocorrer alterações na sua composição química.

Sendo assim, com o objetivo de observar possíveis mudanças causadas pela degradação de compostos durante o tempo de aquisição foram adquiridos sucessivos (totalizando 14 espectros) espectros de RMN HR-MAS de ^1H a 283 K com 256 promediações que resultaram em tempo de aquisição de 22 min cada. Este ensaio revelou a degradação sucessiva principalmente da sacarose (Figura 30), demonstrando que o tempo de aquisição deve ser o menor possível.

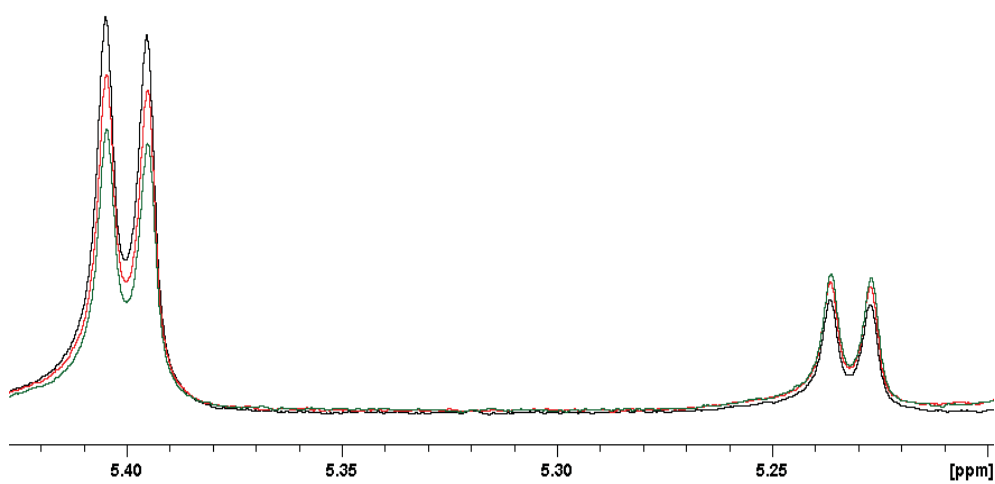


Figura 30: Sobreposição dos sinais de α - glicose (5,23 ppm), sacarose (5,40 ppm).

O sinal referente ao hidrogênio da sacarose em 5,40 ppm apresentou leve diminuição da intensidade durante o tempo de aquisição, isto se deve a hidrólise da

sacarose em glicose e frutose (Figura 30), que pode ser evidenciado pela diminuição da intensidade do sinal em 5,40 ppm (Figura 31).

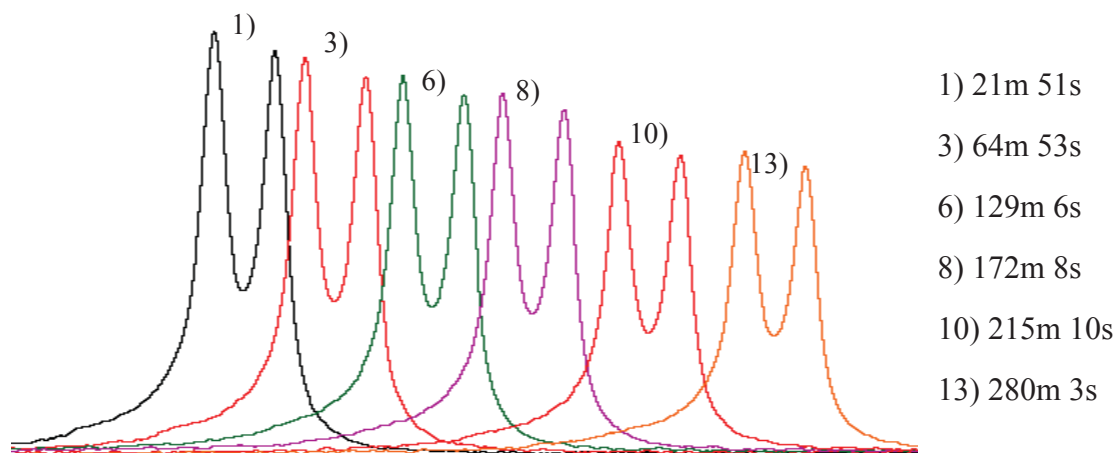


Figura 31: Sobreposição dos sinais do hidrogênio da sacarose em 5,40 ppm obtidos em sequência.

Quando observadas as intensidades dos sinais dos hidrogênios da α -glicose (5,23 ppm, anomérico) e da β -glicose (3,23 ppm), nota-se o aumento da concentração de ambos os açúcares. O mesmo pôde-se observar no sinal de frutose (3,73 ppm). Tais evidências comprovam a hidrólise da sacarose durante o tempo de aquisição dos espectros.

No intuito de avaliar as mudanças ocorridas na composição química do morango durante o descongelamento e exposição ao ambiente, foi adquirido espectros com as amostras recém-descongeladas e a cada 2h. Foi observado que a intensidade do sinal de sacarose (5,40 ppm) diminui com o decorrer do tempo (Figura 32). Portanto, a amostra deve ser descongelada e imediatamente inserida no rotor para aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H .

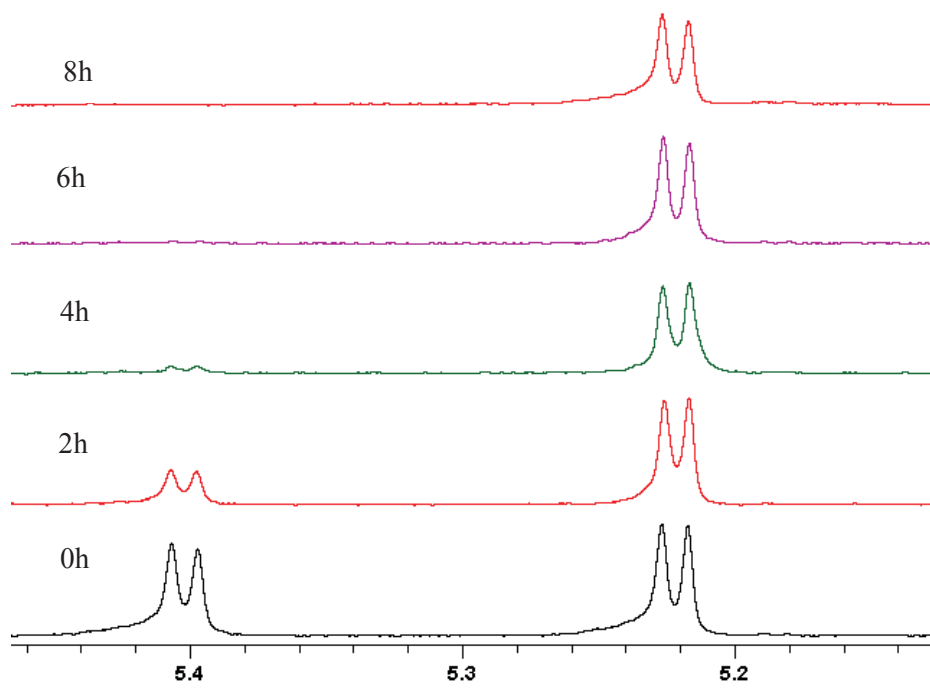


Figura 32: Comparação dos sinais dos hidrogênios em 5,40 ppm (sacarose) e 5,23 ppm (α -glicose) obtidos durante os testes de degradação à temperatura ambiente.

Como as amostras de morango se mostraram bastantes suscetíveis ao processo de degradação, foi avaliada a influência de sucessivos descongelamentos causados pelo desligamento involuntário do freezer. Os espectros de RMN HR-MAS de ^1H apresentaram pequenas variações de deslocamento químico. O estresse causado pelo descongelamento provocou o aumento da concentração dos ácidos cítrico e málico e da asparagina que pode ser observado na região entre 2,26 – 3,03 ppm (Figura 33).

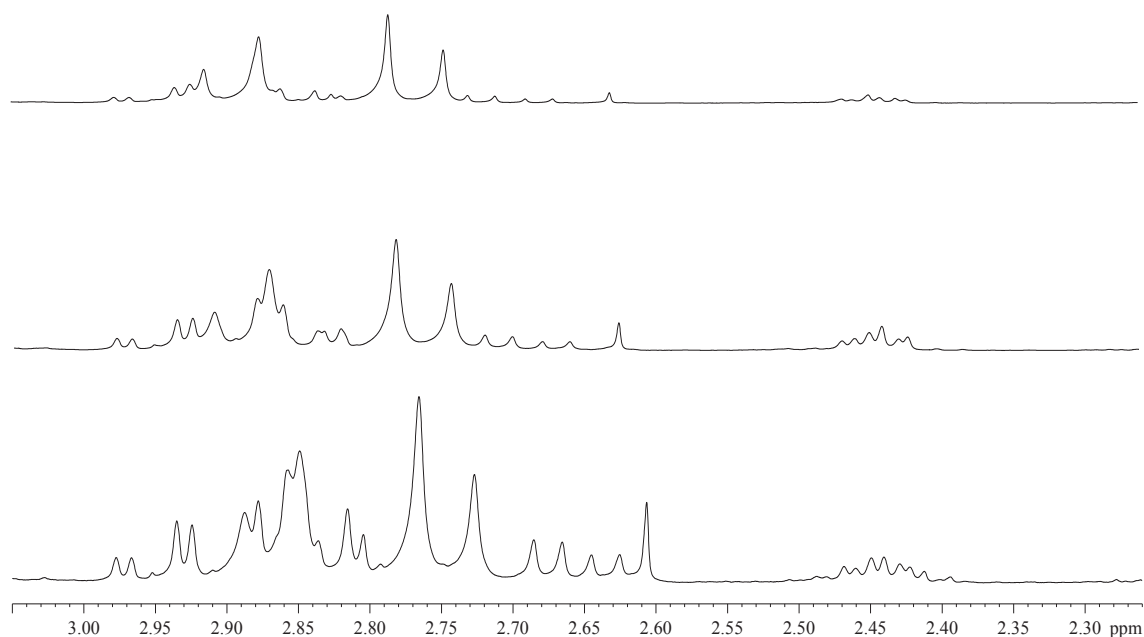


Figura 33: Sobreposição das expansões da região de ácidos orgânicos e aminoácidos.

4.6 Avaliação de velocidade de giro

A alta frequência de rotação da amostra no ângulo mágico ($54,74^\circ$) diminui o alargamento dos sinais devido ao deslocamento químico anisotrópico, acoplamento dipolar e diferenças na susceptibilidade magnética da amostra. Porém, a frequência de rotação (velocidade de giro) deve ultrapassar o acoplamento dipolar. Neste propósito foram testadas as velocidades de giro de 3000 a 6000 Hz com aumento gradual de 500 Hz. Entretanto, foi observado que a frequência de rotação gera bandas laterais com deslocamento químico igual à frequência de giro utilizada (Figura 34). Assim, a velocidade de giro deve ser maior que a frequência da região espectral de interesse.

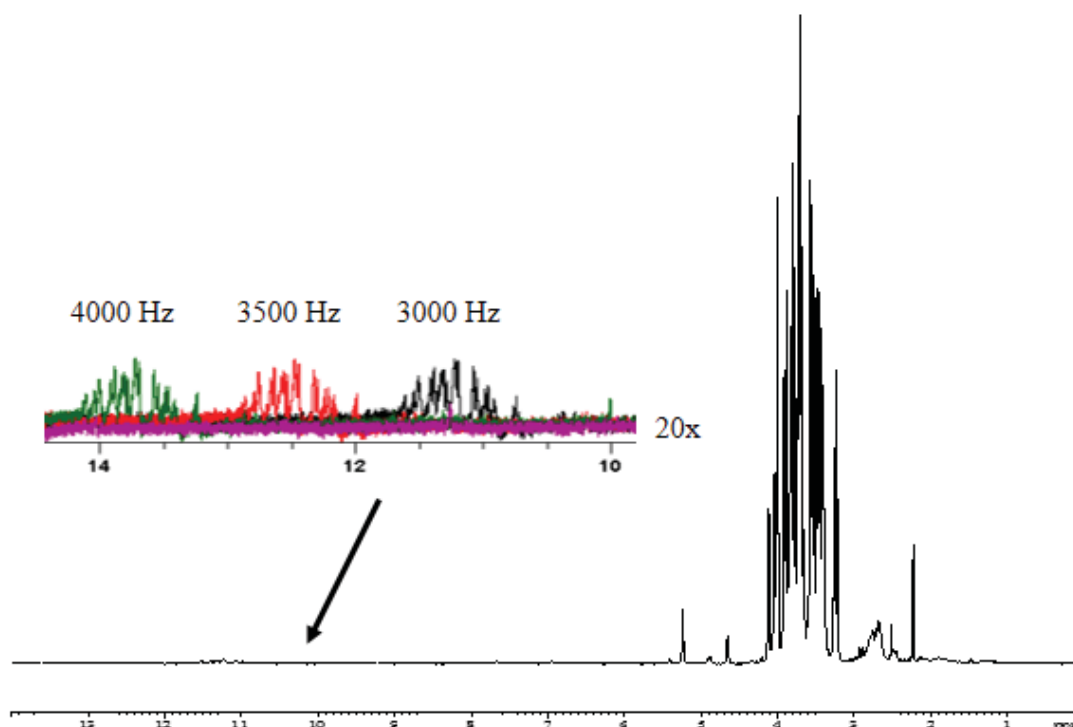


Figura 34: Sobreposição dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H mostrando as bandas laterais geradas pela velocidade de giro.

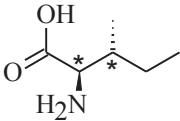
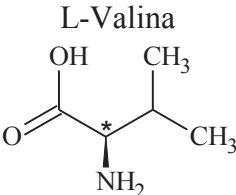
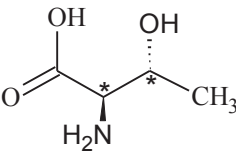
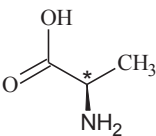
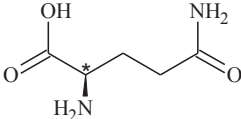
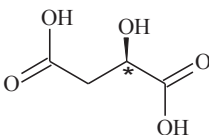
Com a frequência de rotação de 3000 Hz aparece um conjunto de sinais em 11,26 ppm que vai se deslocando para regiões mais altas com o aumento da frequência de rotação, ficando fora da janela espectral com frequência de rotação acima de 4500 Hz. Porém, os sinais de bandas laterais gerados com frequência de rotação estudados não interferiram na região de sinais de interesse (0,5 a 9,0 ppm). Assim, considerando que a frequência de rotação auxilia na melhora de resolução, pois, elimina sinais de acoplamento dipolar, foi determinada a frequência de rotação de 5000 Hz.

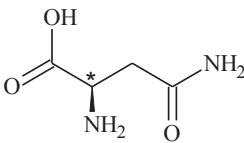
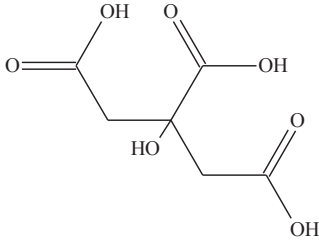
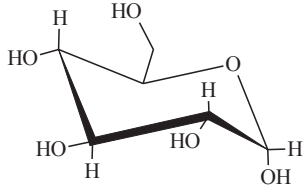
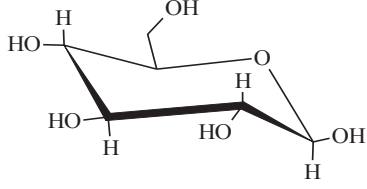
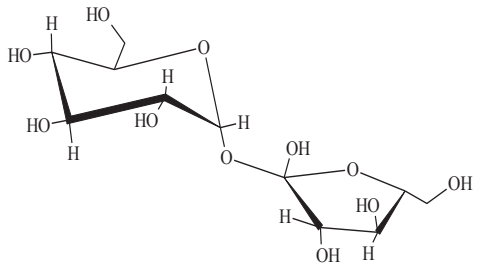
4.7 Identificação de compostos do morango

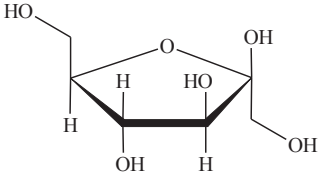
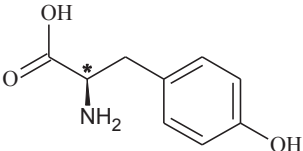
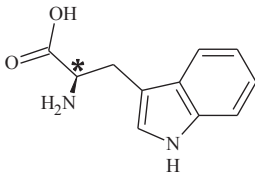
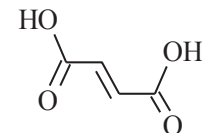
A identificação dos compostos presentes no morango foi realizada através da comparação dos dados espectrais obtidos com aqueles descritos na literatura e adição de padrão. Visto que a proporção das substâncias pode variar de fruto para fruto, verificou-se que alguns compostos não puderam ser identificados em todas as amostras analisadas. Portanto, em frutos com quantidade muito pequena de uma determinada substância, a técnica de RMN HR-MAS de ^1H pode não ser eficiente para sua

identificação. A partir do conjunto de espectros foram identificados uma série de compostos (Tabela 3, Figura 35 e 36). Os sinais provenientes da asparagina foram caracterizados através da adição de padrão (MERCK®).

Tabela 3: Compostos identificados das amostras de morango através de espectros de RMN HR-MAS de ^1H .

Número	Substância	δ (ppm) J / Hz	Atribuição
1	L-Isoleucina 	0,93 <i>t</i> (7,4)	δ -CH ₃
		1,01 <i>d</i> (7,0)	β -CH ₃
2	L-Valina 	0,98 <i>d</i> (7,0)	CH ₃
		1,03 <i>d</i> (7,0)	CH ₃
		3,64 <i>d</i> (1,2)	α -CH
3	L-Treonina 	1,32 <i>d</i> (6,6)	
4	L-Alanina 	1,47 <i>d</i> (7,3)	CH ₃
		3,80	CH
5	L-Glutamina 	2,13 <i>m</i>	β -CH ₂
		2,45	γ -CH ₂
		3,79	α -CH ₂
6	Ácido málico 	2,40 <i>dd</i> (15,4; 9,8)	β' -CH ₂
		2,69 <i>dd</i> (15,4; 3,2)	β -CH ₂
		4,31	α -CH

7	L-Asparagina 	2,93 <i>dd</i> (16,9; 7,6)	β' -CH
		2,96 <i>dd</i> (16,9; 4,4)	β -CH
8	Ácido cítrico 	2,56 <i>d</i> (15,3)	α , γ -CH
		2,68 <i>d</i> (15,3)	α' , γ' -CH
9	α -D-glicose 	5,22 <i>d</i> (3,8)	H1
		3,57	H2
		3,73	H3 e H6
		3,44	H4
		3,88	H6'
10	β -D-glicose 	4,63 <i>d</i> (7,9)	H1
		3,23 <i>dd</i> (9,1; 7,9)	H2
		3,52	H3
		3,42	H4
11	Sacarose 	5,40 <i>d</i> (3,9)	H1
		4,23	H3

12	<p style="text-align: center;">Frutose</p> 	4,10 <i>d</i> (3,8)	3H
13	<p style="text-align: center;">L-Tirosina</p> 	6,89 <i>d</i> (8,5)	H3 e H5
		7,19	H2 e H6
14	<p style="text-align: center;">Tryptofano</p> 	7,55 <i>d</i> (7,9)	H7
		7,72	H4
15	<p style="text-align: center;">Ácido fumárico*</p> 	6,53	

*Presente no fruto verde. *d*= duplete; *dd*= duplo duplete; *t*= tripleto; *m*= multiplete.

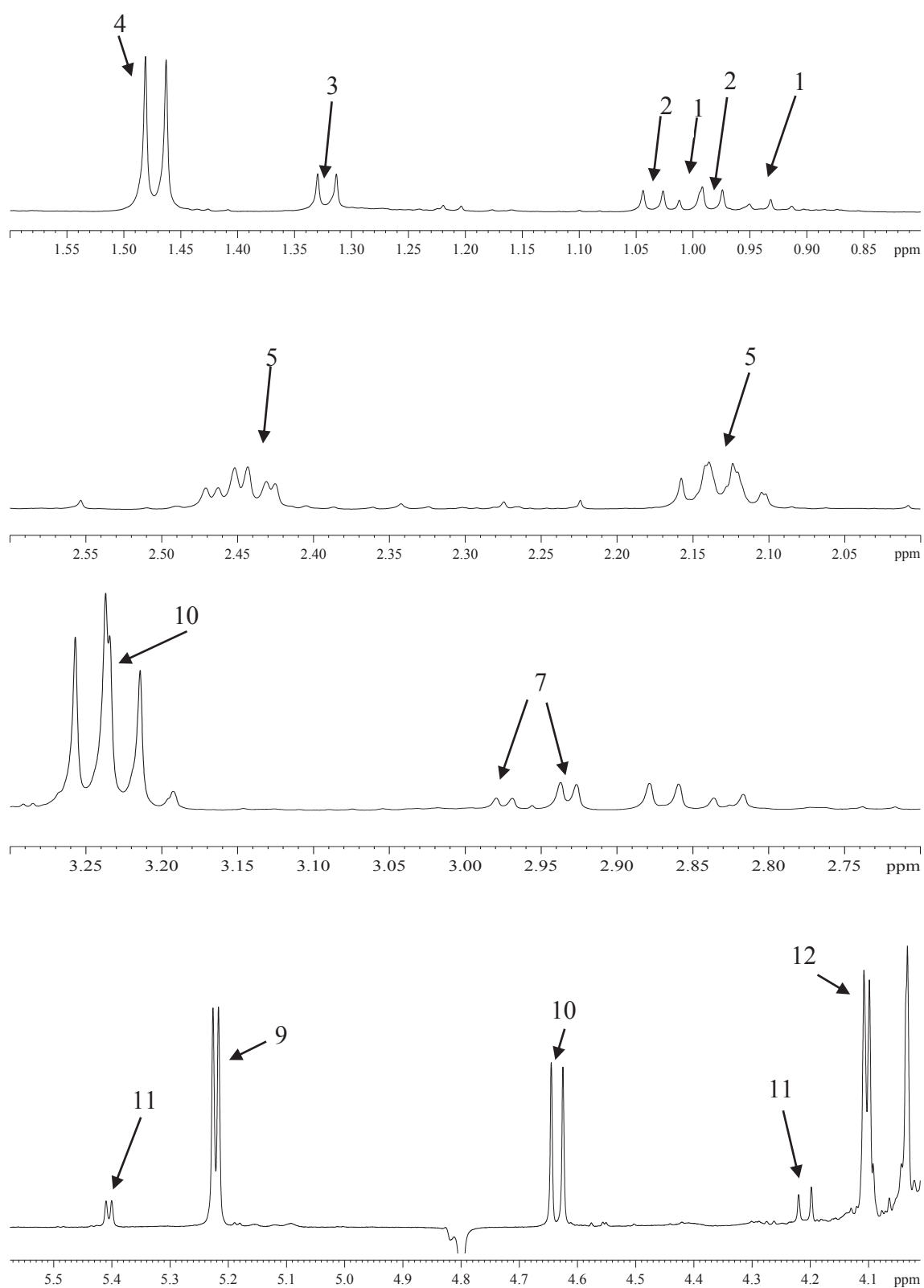


Figura 35: Expansão dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H de duas amostras de morango com atribuições de acordo com a numeração da Tabela 3.

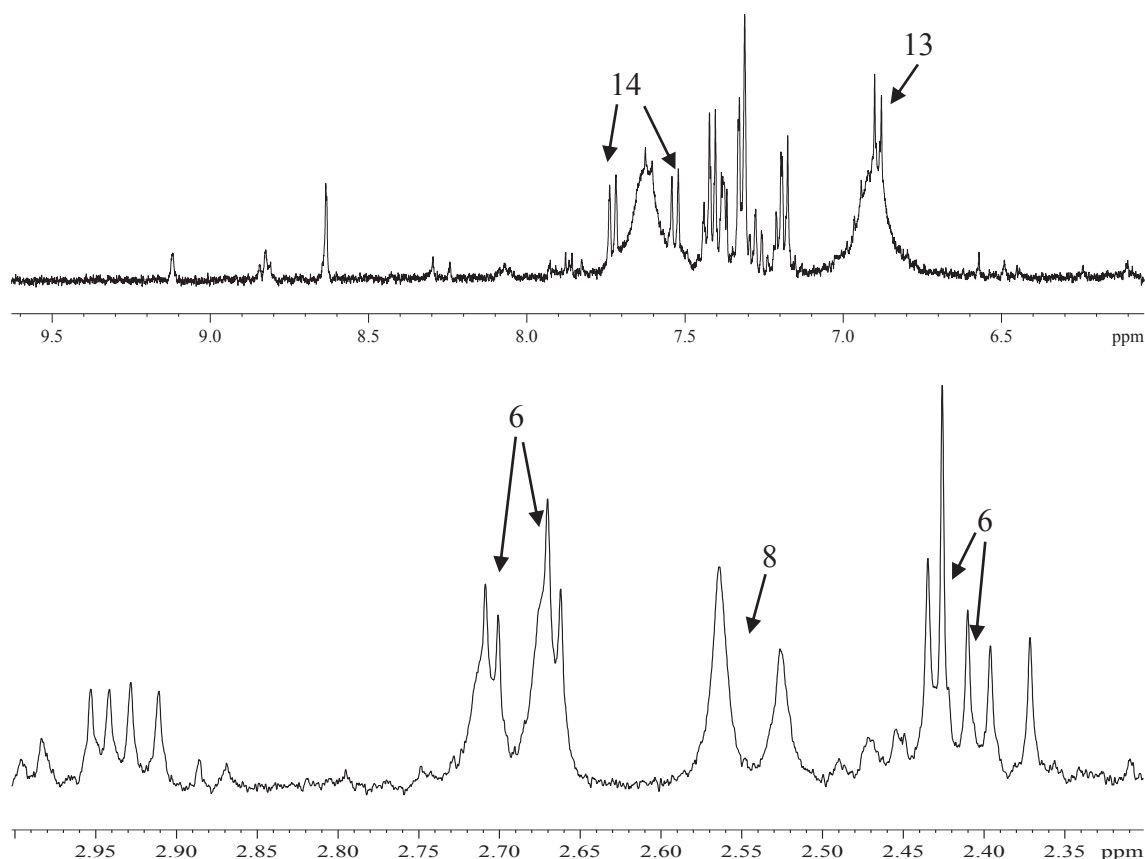


Figura 36: Expansão dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H de duas amostras de morango com atribuições de acordo com a numeração da Tabela 3.

Esses compostos foram identificados em frutos como tomate por Pérez e colaboradores (2011) através da técnica de RMN HR-MAS de ^1H , sendo doze deles em comum com o morango, exceto sacarose e ácido fumárico.

A avaliação de quatro estádios de maturação da uva e após sua colheita por Ali e colaboradores (2011), utilizando RMN em solução identificaram 35 compostos, dentre os quais: valina, alanina, treonina, α e β -glicose, sacarose, ácidos cítrico, málico e fumárico que também estão presentes no morango.

A investigação da composição química da maçã pela técnica de RMN HR-MAS permitiu identificar 30 compostos. Destes, oito estão presentes também no morango: isoleucina, valina, treonina, alanina, ácido málico, α e β -glicose e sacarose (Vermathen *et al.*, 2011).

Nesses trabalhos foram identificados compostos característicos de frutos climatéricos (tomate e maçã) e não-climatéricos (uva) pode-se verificar que não existe diferenças significantes, visto que os compostos caracterizados são comuns em ambos

os tipos de frutas, necessitando de uma técnica mais sensível, ou fazer extração de compostos para suas caracterizações.

4.8 Caracterização Físico – Química do Morango

As análises físico-químicas apresentaram o perfil químico das frutas, além de sugerir como ocorre a variação da composição química durante os processos de desenvolvimento e maturação. Foram realizados teste estatísticos ANOVA e posterior teste t para estudo comparativo entre as médias, com confiança de 95%.

Segundo Antunes e colaboradores (2006) o morangueiro passa por 9 estádios fenológicos durante a floração, frutificação e maturação dos frutos. Destes estádios, os principais envolvidos no desenvolvimento e maturação do morango levam cerca de 11 dias (estádio 6 a 9). O estágio 6, envolve o aumento de tamanho do fruto (fruto verde a branco) leva cerca de 2,2 dias; estágio 7, em que existe a percepção das sementes no fruto (branco) leva em torno de 3,4 dias; estágio 8, marcado pelo início da maturação (rosa), leva 2,2 dias e estágio 9 com frutos de 75 a 100% vermelhos (rosa a vermelho), leva cerca de 3,2 dias.

Observando tal fato pode-se concluir que com o tempo de tratamento de 48h entre alguns estádios possivelmente não seria observado diferenças na composição química dos frutos, devido ao rápido metabolismo no período de maturação (principalmente rosa e vermelho).

4.8.1 Tratamentos Hormonais vs Controle

Índice de Acidez e pH

Em geral os morangos tratados com os fitormônios, apresentaram um decréscimo da acidez durante a maturação (Figura 37 e 38). Porém, a mesma tendência foi observada para as amostras do grupo controle. Dessa forma, não podemos atribuir esses efeitos à aplicação dos fitormônios.

Observando todas as amostras tratadas, elas possuem comportamento muito parecido durante a maturação e tempo de tratamento, apenas na amostra de fruto branco do grupo de controle houve um aumento com tempo de tratamento (alto desvio padrão). Esse decréscimo é esperado durante a maturação, já que estes compostos são

consumidos no ciclo de Krebs, e ainda servem de substrato para síntese de aminoácidos aromáticos, antocianinas e ligninas. Estatisticamente os valores médios do índice de acidez das amostras controle são diferentes entre os tempos, bem como entre os estádios de maturação.

Os tratamentos dos morangos com ABA apresentaram discrepâncias no índice de acidez nos estádios de maturação rosa e vermelho 24 h, após aplicação do fitormônio (Figura 37). Comparando resultados médios de amostras tratadas e do grupo controle, o grupo controle apresentou comportamento diferenciado, principalmente nos estádios branco e ainda possuem valores de desvio padrão maiores em relação ao grupo de amostras tratadas, indicando maior linearidade dos dados para as amostras tratadas. Entretanto tal comportamento não pode ser atribuído ao tratamento hormonal.

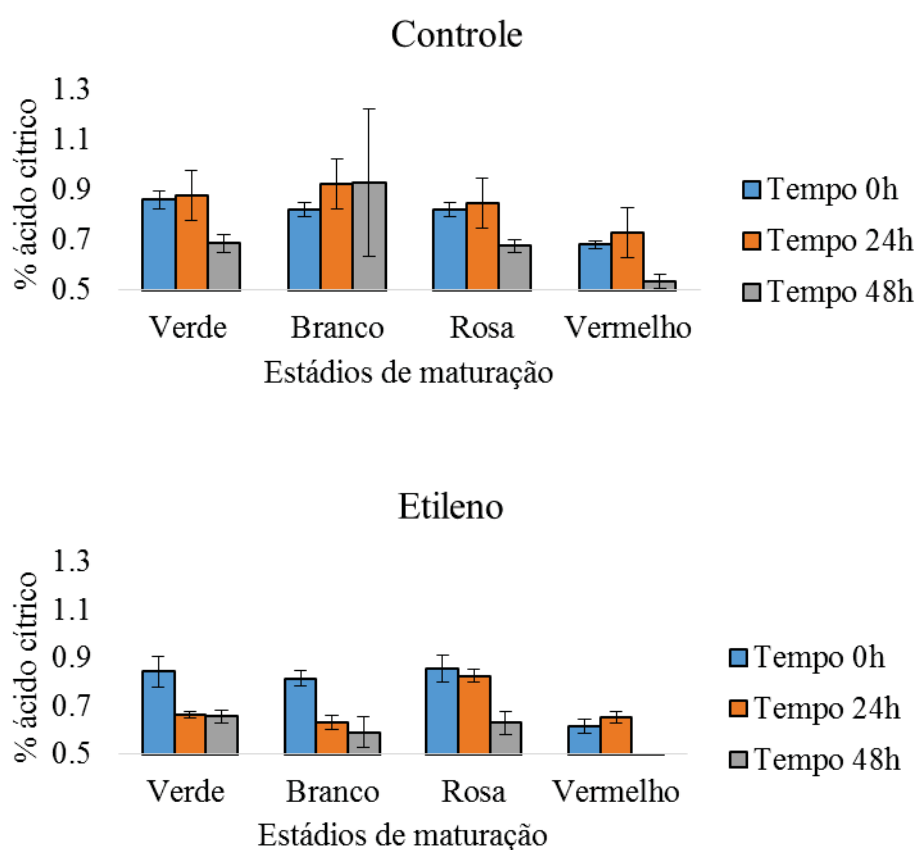


Figura 37: Índice de acidez do morango tratados com etileno e amostras controle.

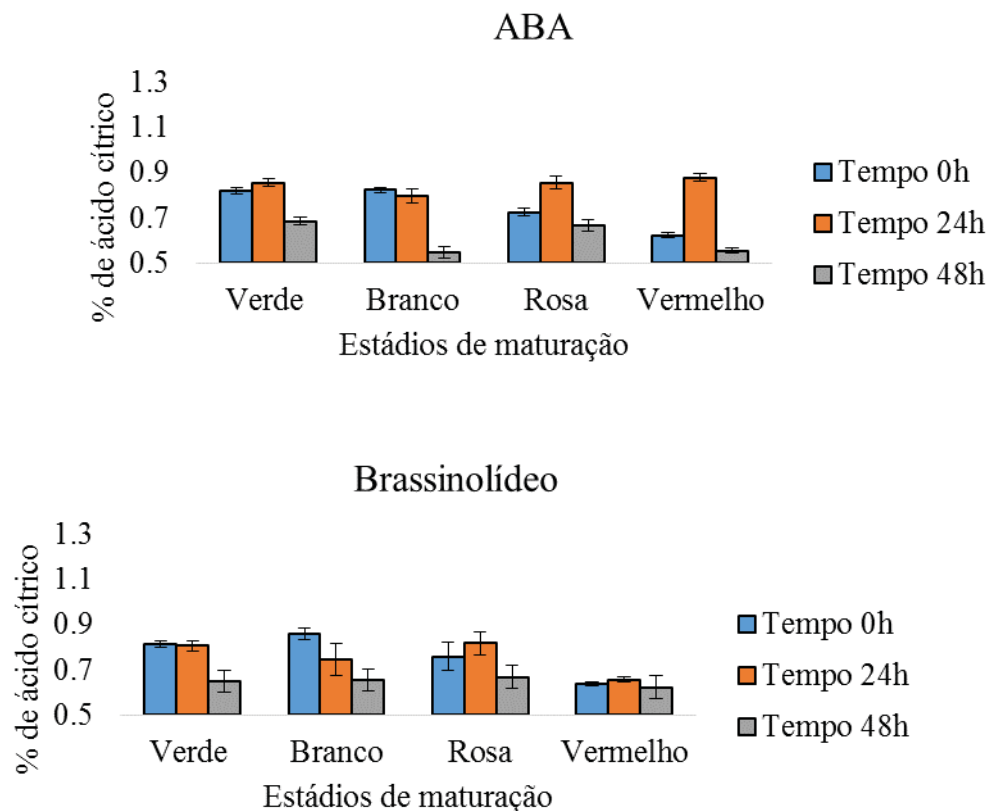


Figura 38: Índice de acidez do morango tratados com ácido abscísico e brassinolídeo.

Avaliando-se os dados de pH dos morangos foi possível verificar um aumento com o decorrer da maturação para as amostras tratadas com fitormônios, enquanto aquelas do grupo controle. Também foi observado o aumento consecutivo do pH, 24 e 48 h, após cada tratamento. No entanto, o mesmo comportamento foi observado para as amostras do grupo controle (Figura 39). Estes resultados comprovam que os fitormônios não influenciam no pH das frutas.

Analisando-se os gráficos de pH, pode-se notar que não há alteração significativa do pH entre os estádios de maturação verde e branco (exceto para amostras tratadas com etileno que apresenta diferenças de pH já nos estádios verde e branco). Por outro lado, após o estágio branco até o vermelho ocorre uma elevação do pH, da mesma forma que diminui o índice de acidez dos frutos (Figura 39). Esse comportamento confirma dados de índice de acidez, visto que ocorre uma diminuição de ácidos orgânicos devido ao ciclo de Krebs.

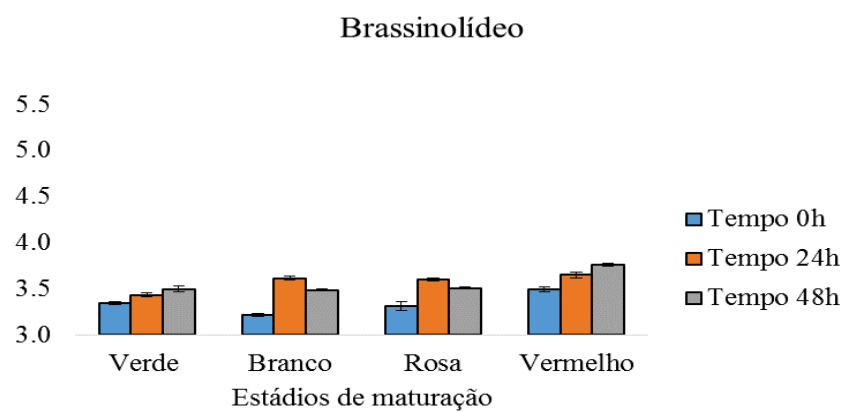
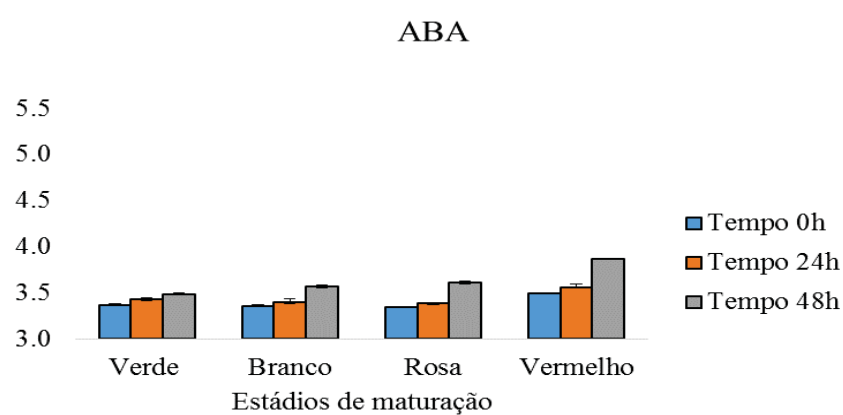
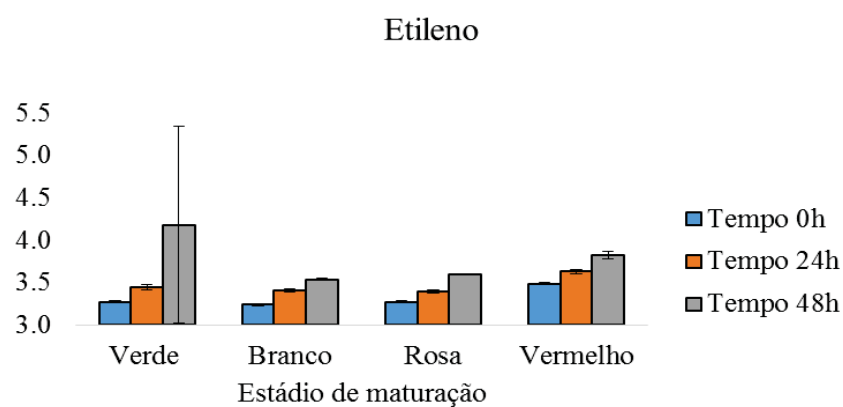
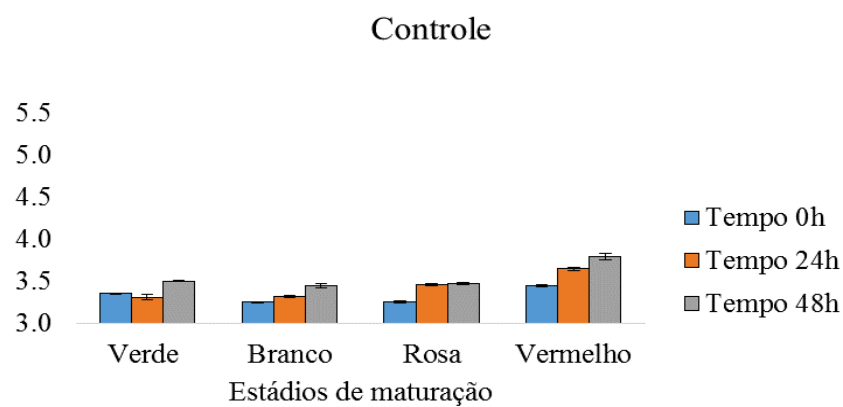


Figura 39: Variação do pH das amostras de morango tratados com fitormônios e controle.

Teor de Açúcares Totais

Analisando-se as amostras do grupo controle, nota-se um aumento progressivo no teor de açúcares totais. Por outro lado, isso não ocorre nas amostras tratadas com fitormônios, em que não houve tendências, nem aumento ou diminuição dos teores de açúcares em função dos tratamentos, quando comparados com as amostras do grupo controle. Pode-se concluir que a aplicação dos fitormônios perturbou a produção de açúcares, uma vez que não foi observado nenhum aumento gradual (Figura 40 e 41).

O aumento do teor de açúcares totais nas amostras do grupo controle pode ser explicado pela hidrólise de polissacarídeos de reserva, que são hidrolisados no processo de liberação energética. Desta forma, estes fitormônios perturbam os processos de biossíntese destes compostos.

A sacarose é um dos principais açúcares no fruto, sendo hidrolisado em frutose e glicose. Estes são os principais açúcares presentes nas frutas, e principais fontes energéticas nos processos de desenvolvimento e maturação.

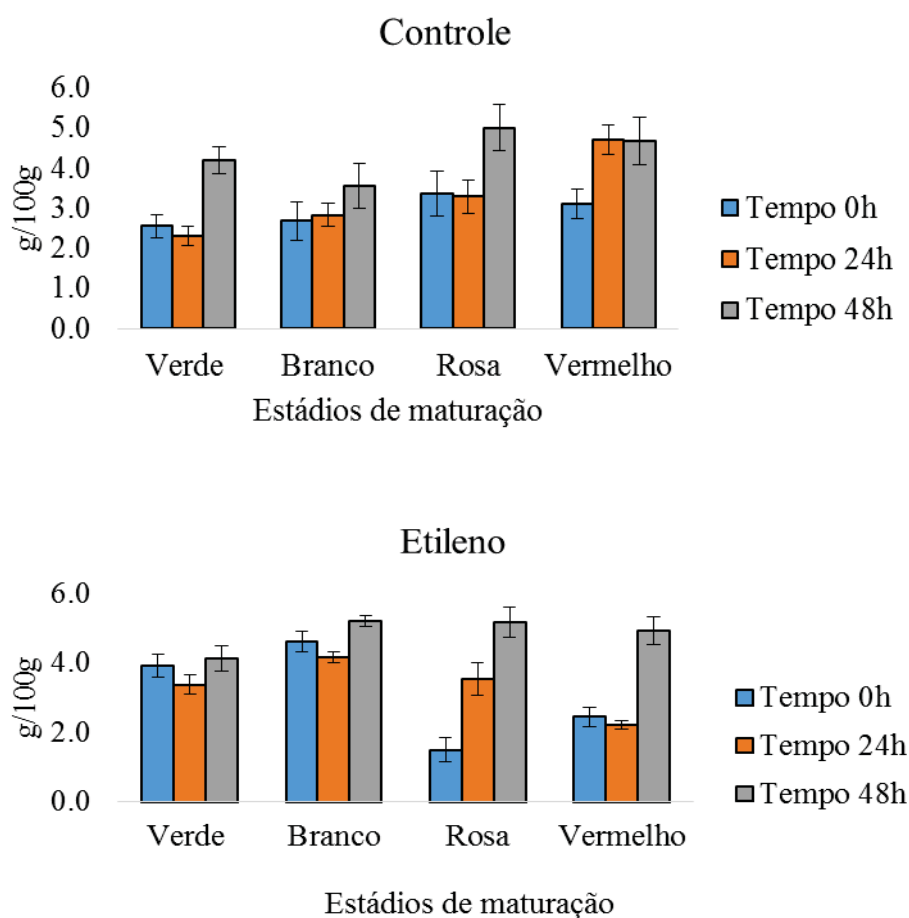


Figura 40: Teor de açúcares totais das amostras tratados com fitormônios e controle.

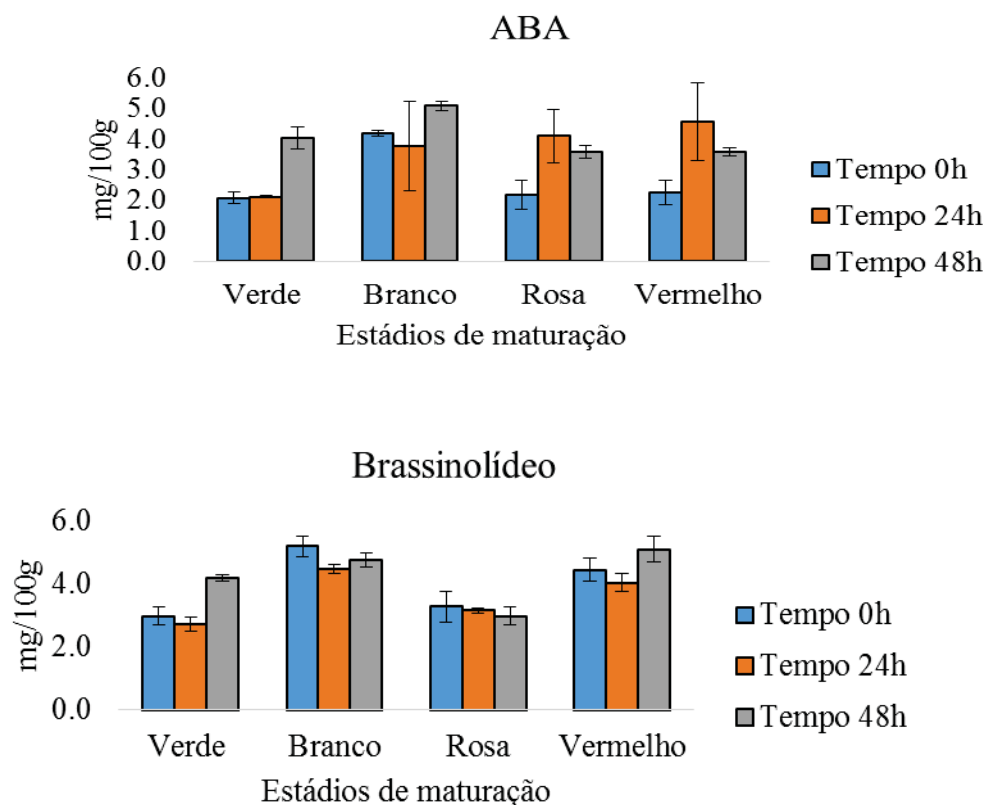


Figura 41: Teor de açúcares totais das amostras tratados com fitormônios e controle.

Teor de sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis nas amostras tratadas com os fitormônios etileno e ABA apresentaram aumento durante a maturação, enquanto amostras tratadas com brasinolídeo e do grupo de controle observou-se um comportamento diferenciado nas nos tempos de maturação. No grupo de amostras controle estágio branco não acompanha o aumento de sólidos solúveis, as amostras tratadas com brasinolídeo se diferenciou dos demais, apresentando um decréscimo (exceto amostras estágio branco). Entretanto as médias dos frutos verdes e brancos, bem como, rosa e vermelhos são estatisticamente iguais para todos os grupos. Tal fato se deve a maturação quando ocorre o acúmulo de compostos hidrossolúveis, principalmente, a partir do estágio branco, e não se pode atribuir este comportamento ao tratamento hormonal (Figura 42).

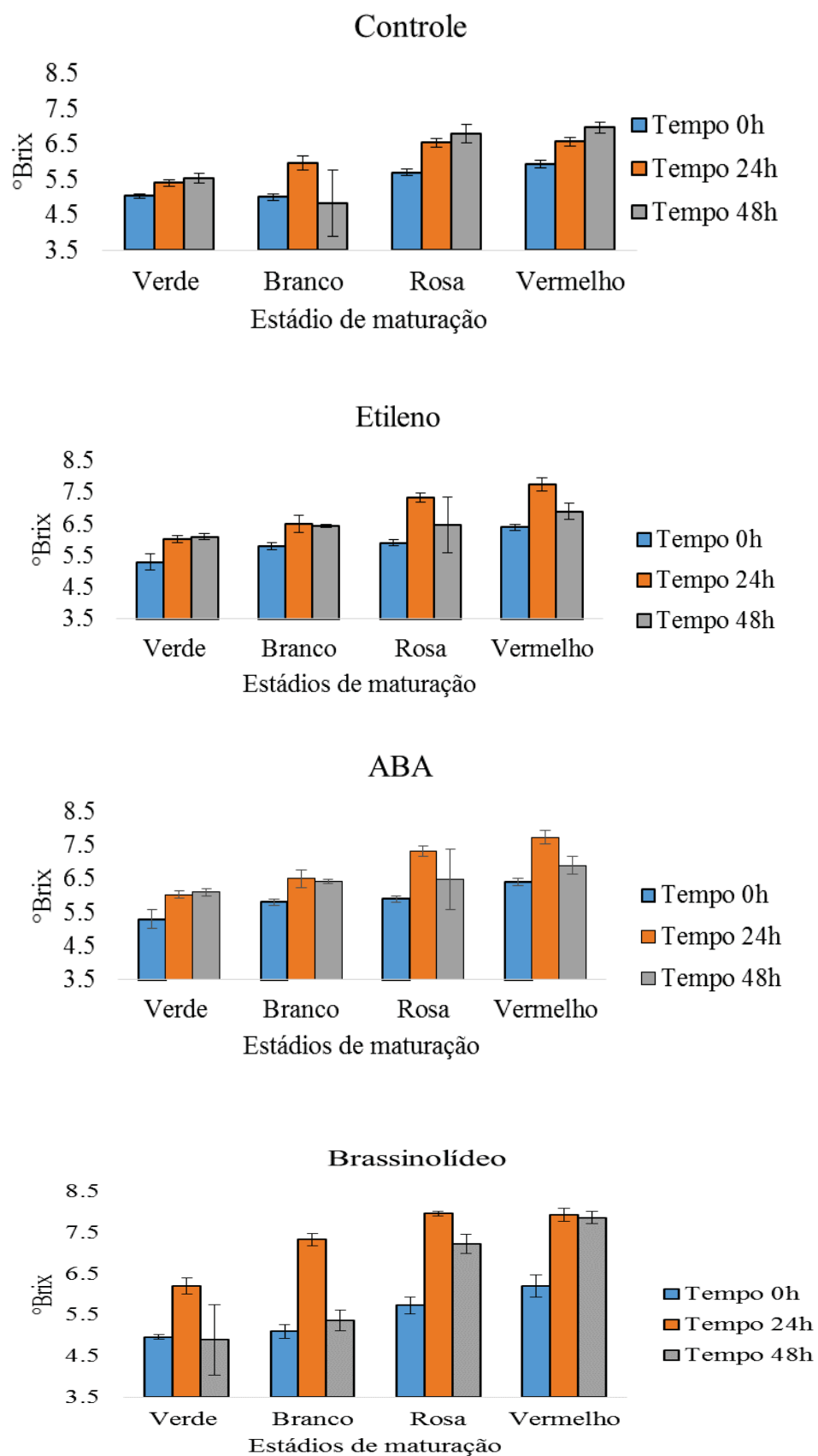


Figura 42: Teor de sólidos solúveis das amostras com fitormônios e controle.

Teor de antocianinas

Foi observado um aumento progressivo do teor de antocianinas durante a maturação, tanto para as amostras do grupo controle quanto aquelas submetidas ao tratamento com os fitormônios (Figura 43 e 44). Estes compostos começam a ser significativamente sintetizados a partir do morango no estágio de maturação branco, bem como o aumento de açúcares (já observado) aumenta a glicosidação destes compostos, indicando assim, o início da maturação dos frutos. Desta maneira, o estágio verde, bem como tempo 0 h no estágio branco, não possuem tais compostos de forma significativa. Quando comparado o comportamento das amostras tratadas e não tratadas observou-se que não houve alterações significativas nestes compostos por ocasião do tratamento.

A justificativa de ter sido detectado antocianinas no estágio de maturação branco, após 24 h se deve ao rápido amadurecimento do morango. Nesse contexto, a fruta pode amadurecer em intervalos menores que três dias (Antunes, 2006). As alterações na coloração durante o amadurecimento ocorre principalmente pela degradação da clorofila e aumento gradual de compostos responsáveis pela coloração.

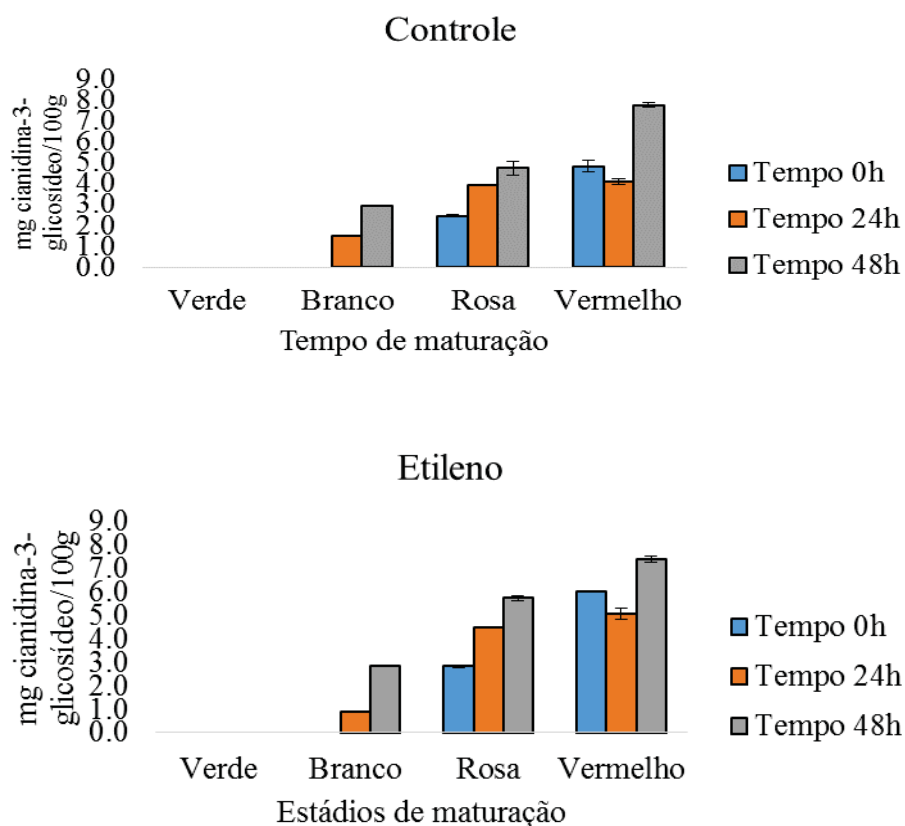


Figura 43: Teor de antocianinas das amostras do tratadas etileno e amostras controle.

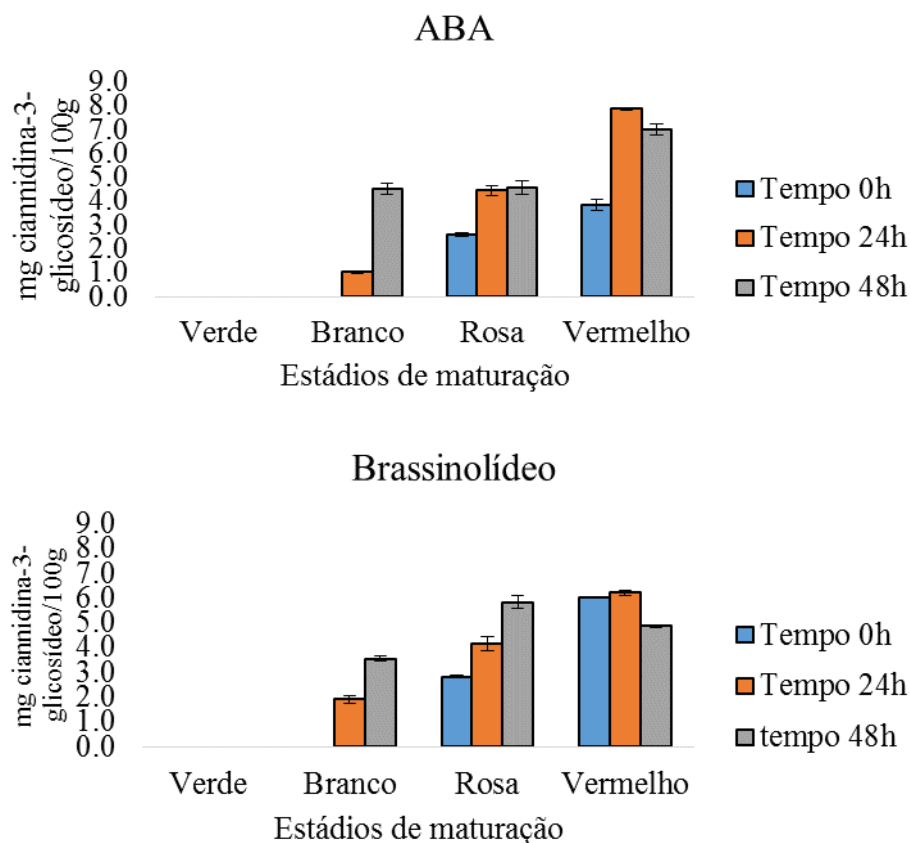


Figura 44: Teor de antocianinas das amostras do tratadas ácido abscísico e brassinolídeo.

Teor de compostos fenólicos

Os teores de compostos fenólicos das amostras tratadas com etileno e ABA foram estatisticamente iguais para as amostras controle e brassinolídeo. Enquanto amostras tratadas com etileno e ABA, as amostras dos estádios verde e branco tem suas médias estatisticamente diferentes (Figura 45).

Os teores de compostos fenólicos das amostras tratadas com etileno apresentaram dois valores acentuados durante o tratamento, ambos para o tempo 48h no fruto verde e branco, indicando uma possível ação mais acentuada nestes estádios, com 48h após a aplicação. No entanto, excluindo-se o tempo de 48 h observou-se, em geral, um decréscimo no teor de compostos fenólicos (Figura 45).

Os compostos fenólicos têm como função na planta, a proteção contra estresse biológicos e ambiental, sendo sintetizados como resposta a ataque de fungos, infecções bacterianas, alta exposição à radiação ultravioleta, limitações nutricionais, entre outros fatores.

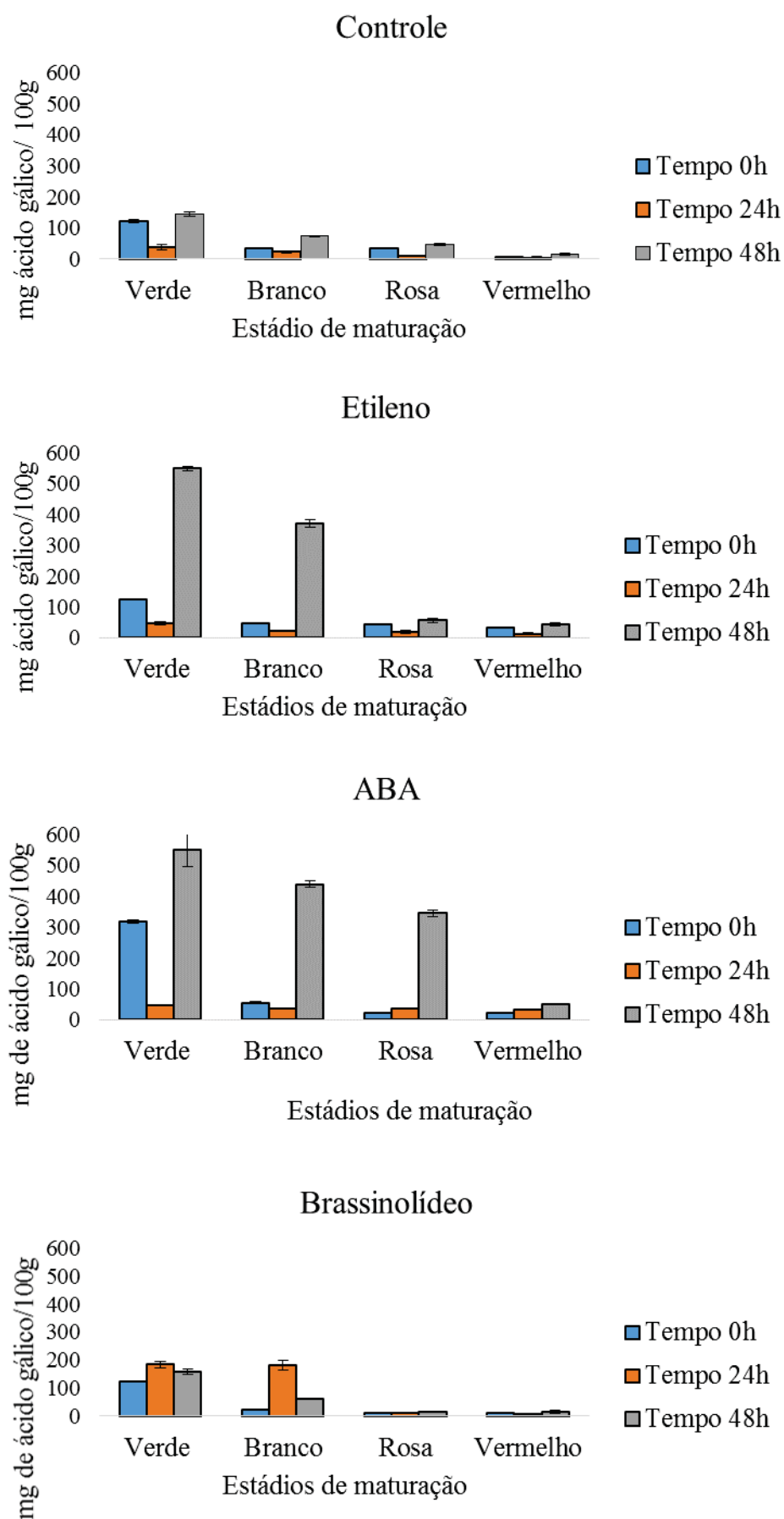


Figura 45: Teor de antocianinas das amostras do tratadas etileno e amostras controle.

Índice de firmeza

A diminuição da firmeza foi observada durante a maturação. Para as amostras de morango do grupo de controle as médias são estatisticamente diferentes nos estádios de maturação e no decorrer dos tempos de tratamento (0, 24 e 48h). Os morangos avaliados com 48 h para todos os tratamentos, apresentaram as maiores médias de índice de firmeza, sem uma explicação aparente, já que foram realizadas em grupos, todos no mesmo dia e equipamento (Figura 46 e 47).

Excluindo-se as amostras no tempo de 48 h, em geral, observou-se uma redução da firmeza do fruto, indicando que o tratamento realizado com os fitormônios não foi efetivo.

Uma das principais alterações durante o amadurecimento é a diminuição da firmeza, decorrente da despolimerização da pectina da parede celular e acúmulo de água no tecido vegetal.

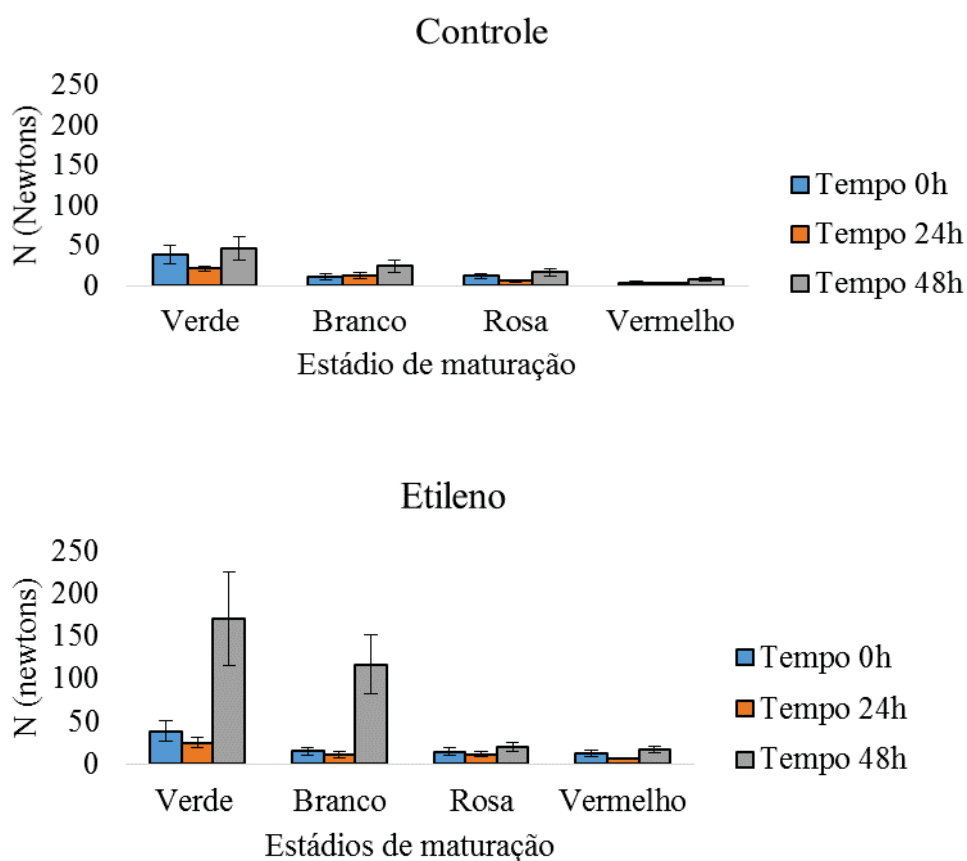


Figura 46: Índice de firmeza das amostras tratadas com etileno e amostras controle.

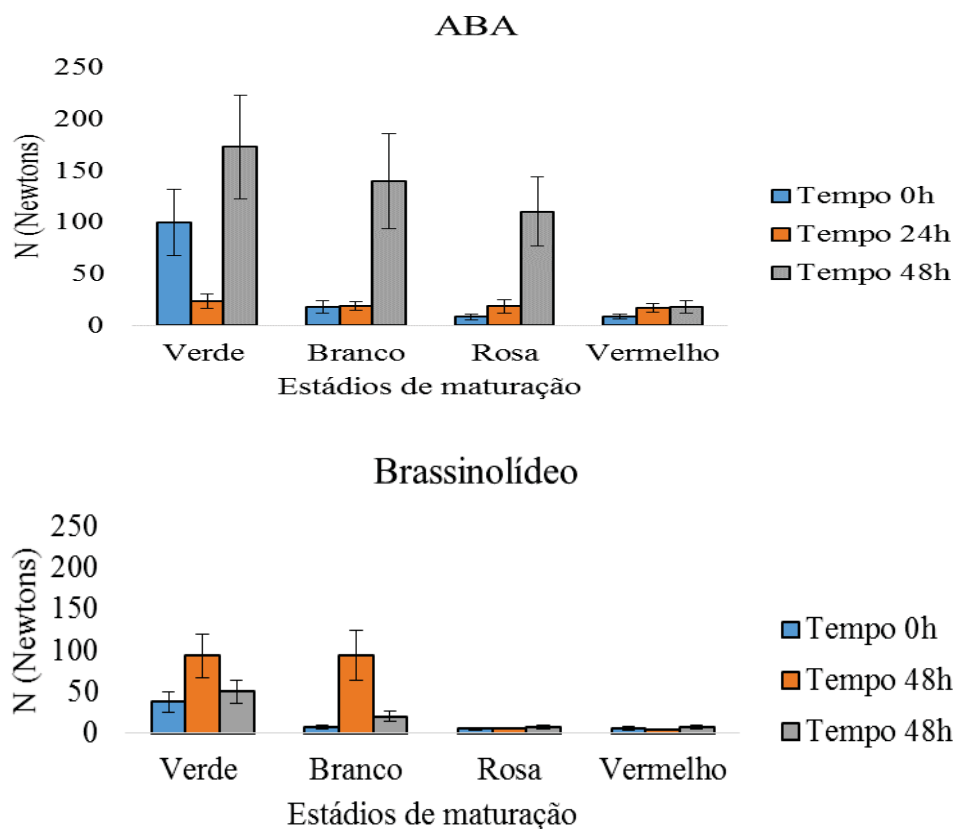


Figura 47: Índice de firmeza das amostras tratadas com fitormônios e controle.

Teor de ácido ascórbico

Os teores de ácido ascórbico de todos os grupos apresentaram aumento do teor de ácido ascórbico com o decorrer da maturação (Figura 48). No entanto, as amostras tratadas apresentaram menores teores de ácido ascórbico, demonstrando que os fitormônios inibiram a produção desse ácido.

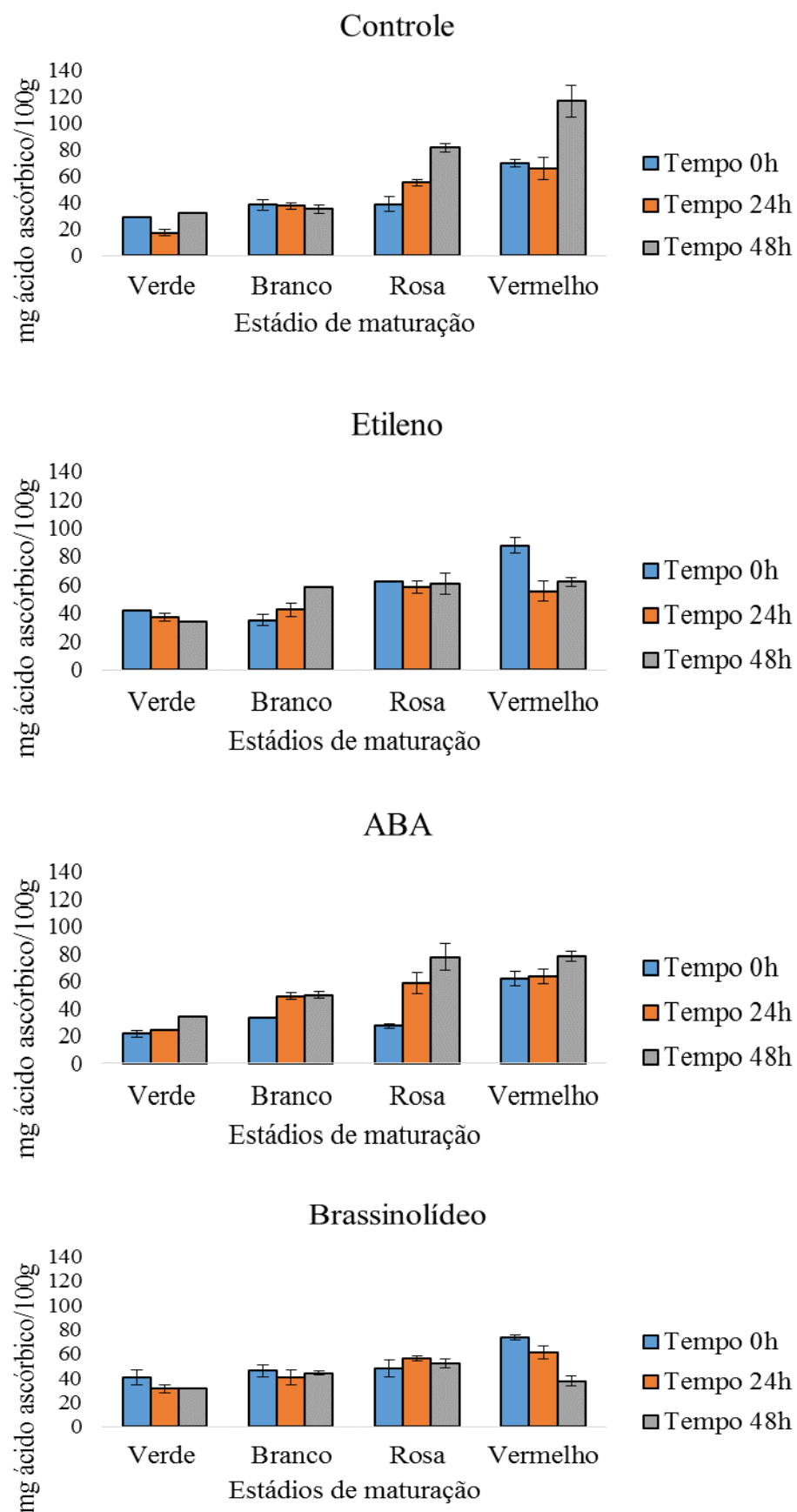


Figura 48: Teor de ácido ascórbico das amostras tratadas com fitormônios e controle.

De modo geral, observou-se que os fitormônios não interferiram de maneira significativa nos parâmetros físico-químicos analisados.

4.9 Análise Multivariada

Os espectros de RMN HR-MAS de ^1H foram submetidos à análise multivariada pela análise de componentes principais (PCA) a fim de detectar as semelhanças e as distinções entre os conjuntos de espectros das amostras submetidas a diferentes tratamentos. As análises multivariadas foram realizadas com auxílio do programa computacional AMIX[®] da Bruker, o qual foi desenvolvido especificamente para analisar dados de RMN.

Nestas análises os deslocamentos químicos são as variáveis e os espectros as amostras. Desta forma cada ponto espectral corresponde a uma variável, por exemplo, um espectro adquirido com 64K pontos possui 65536 variáveis. Essa grande quantidade de variáveis requer grande uso de memória. Além disso, um sinal espectral é representado por vários pontos (dezenas). Desta forma, ao invés de utilizar os pontos espectrais, os espectros são segmentados em pequenos intervalos (*buckets*) os quais são utilizados como variáveis de entrada nas análises quimiométricas.

Foram produzidos *buckets* retangulares com 0,05 ppm de largura, visto que os sinais dos espectros não são alargados e sobrepostos (como citado no item 1.6), diminuindo assim, o número de variáveis a serem processadas. Além disso, pequenas variações nos deslocamentos químicos entre as amostras são minimizadas. Vale ressaltar que os espectros devem ser referenciados em relação ao sinal do TMS- d_4 ou a um sinal presente em todas as amostras.

A área dos *buckets* foi determinada utilizando-se um modo especial de integração o qual independe da correção de fase e da linha de base dos espectros. As áreas obtidas foram normalizadas em relação à soma das intensidades totais. Foi utilizada a região espectral de 0,5 – 8,0 ppm excluindo-se a região entre 4,4 – 5,1 ppm por ser a região de saturação da água e ainda evita problemas relacionados a saturação de sinais vizinhos.

Através dos gráficos de *scores* fornecidos pela PCA foi possível identificar agrupamentos por semelhanças, bem como, amostras anômalas e por meio dos gráficos de influências (*loadings*) identificar os sinais responsáveis pelas discriminações.

Em um primeiro ensaio, objetivando verificar se haveria diferenças entre os tipos de tratamentos, foram analisados todos os espectros obtidos das amostras tratadas e não tratadas, abrangendo todos os tempos após a aplicação dos fitormônios. O tempo 0 h é o mesmo para todos os conjuntos de amostras, portanto, os grupos ABS, BR (brassinolídeo) e ETH (Etileno) apresentam apenas os tempos 24 e 48 h.

Foi observado que PC1 possui maior variância explicada de dados (62,41%), entretanto, não apresenta agrupamentos (Figura 49), que quer dizer, que não apresenta uma ordenação clara de grupos que representem uma característica comum dos espectros. Entretanto, as combinações de PC3 (variância explicada de 6,23%) com os demais PCs (PC2, variância explicada de 21,53% e PC4, variância explicada de 3,44%) apresentam dois agrupamentos segundo PC3 positivo, o que indica uma pequena variação nos componentes responsáveis pela diferenciação dos grupos.

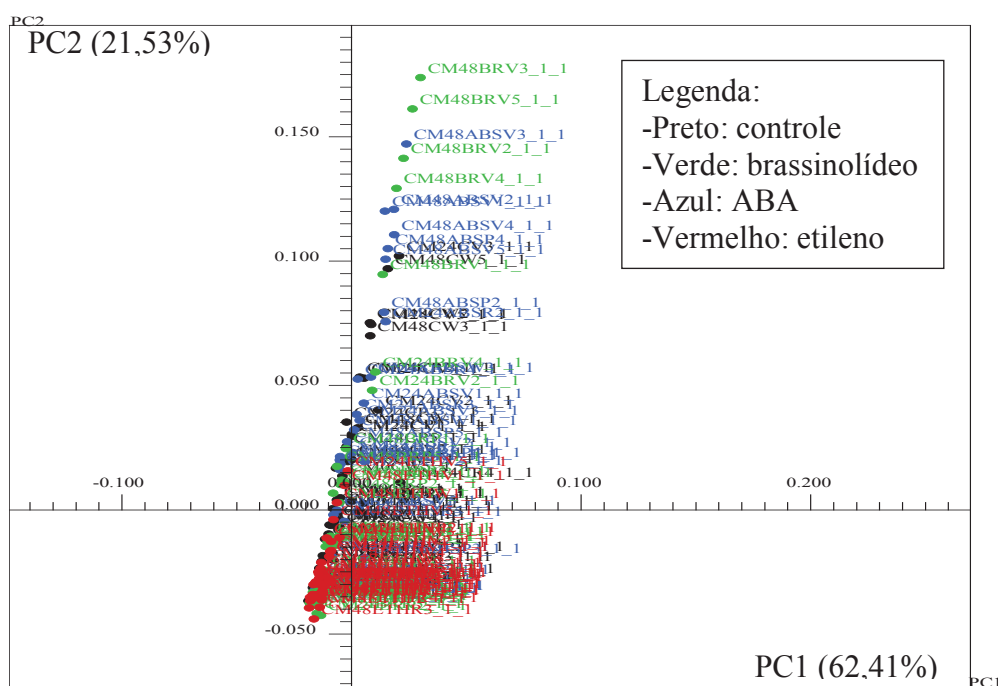


Figura 49: Gráfico de *scores* das combinações PC1 x PC2.

O gráfico de *loadings* indica uma tendência para compostos representados pelos *buckets* na região de 3,32 ppm ainda sinais na região de 2,67; 2,37; 2,62 e 2,52 ppm (Figura 50). Tais sinais são característicos de açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos.

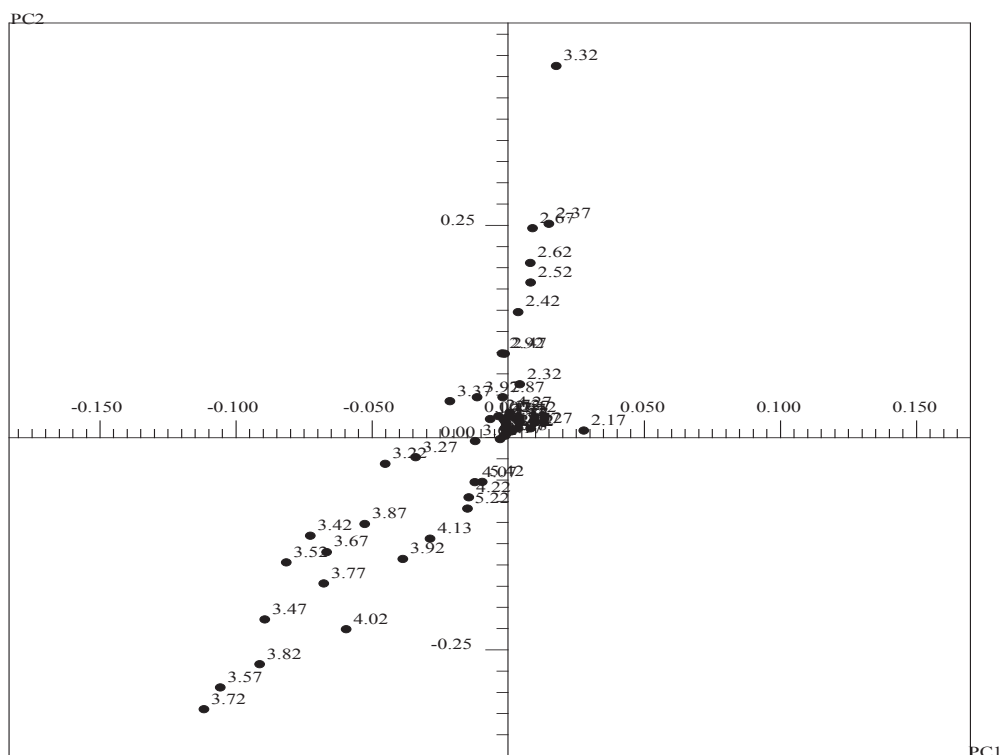


Figura 50: Gráfico de *loadings* das combinações de PC1 x PC2.

A discriminação em dois grupos foi obtida analisando os gráficos de *scores* de PC3 x PC4 (Figura 51). Observando o conjunto de amostras agrupadas não foi possível indicar uma ordem clara, nem ao menos todas as replicatas foram agrupadas. Desta maneira apesar de apresentar dois grupos segundo PC3, estes não representam uma lógica segundo as características das amostras. O gráfico de *loadings* (Figura 51) indicou que os *buckets* na região de 4,02 ppm (açúcares); 4,13 ppm (frutose) e 5,22 ppm (α -glicose) são característicos no grupo de amostras em PC3 positivo.

Analisando as demais combinações de PCs, foi observado o mesmo comportamento para os dois agrupamentos em PC3, sendo estes compostos responsáveis pelo mesmo conjunto de amostras já citado, e com os mesmos *buckets* característicos das amostras (Figuras 52 e 54). A Figura 53 apresenta a expansão na região de do agrupamento das amostras, não indicando ordem clara e que se repete para as demais combinações de PCs.

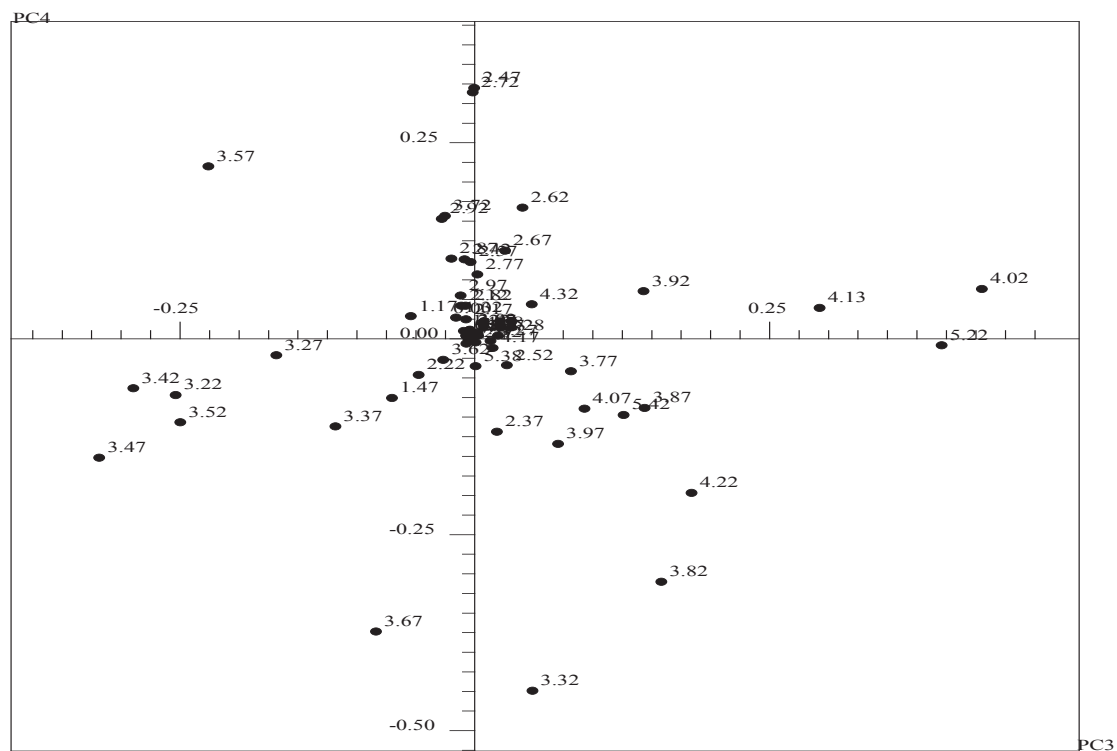
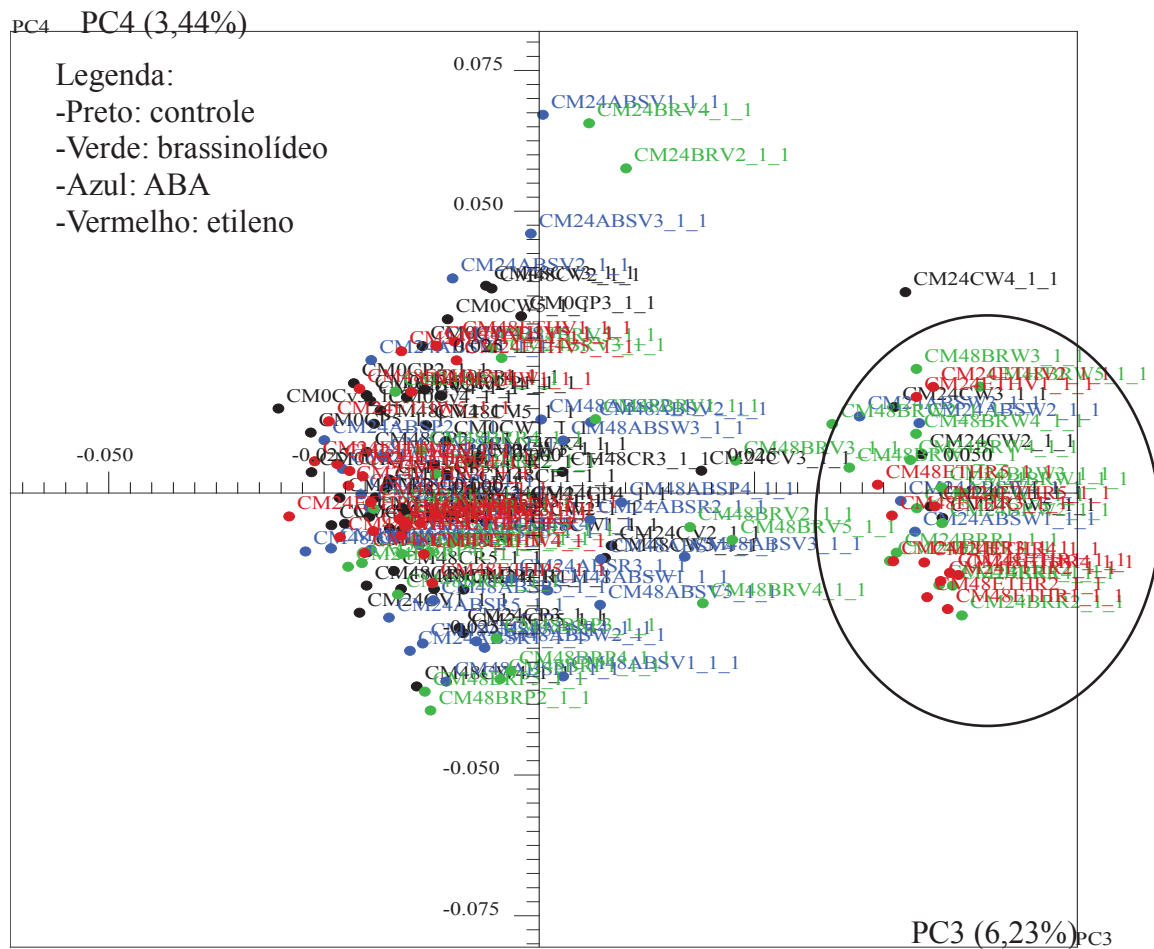
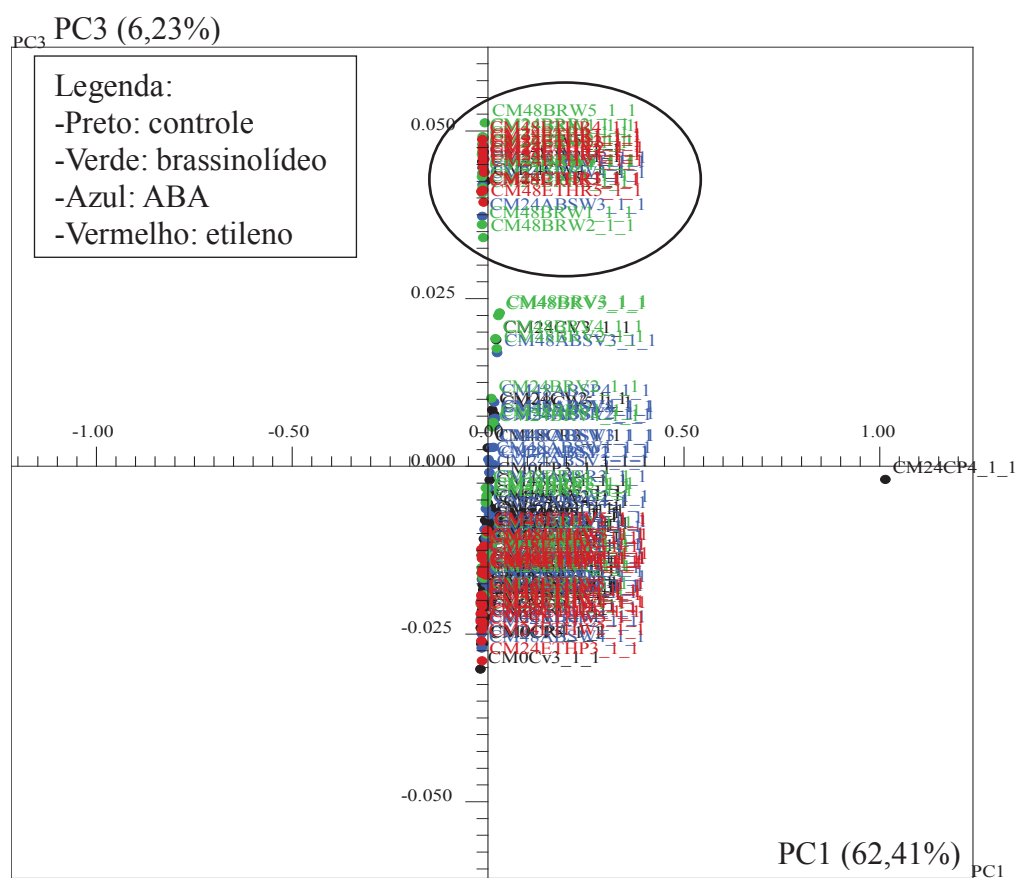


Figura 51: Gráficos de *scores* e *loadings* das combinações de PC3 x PC4.



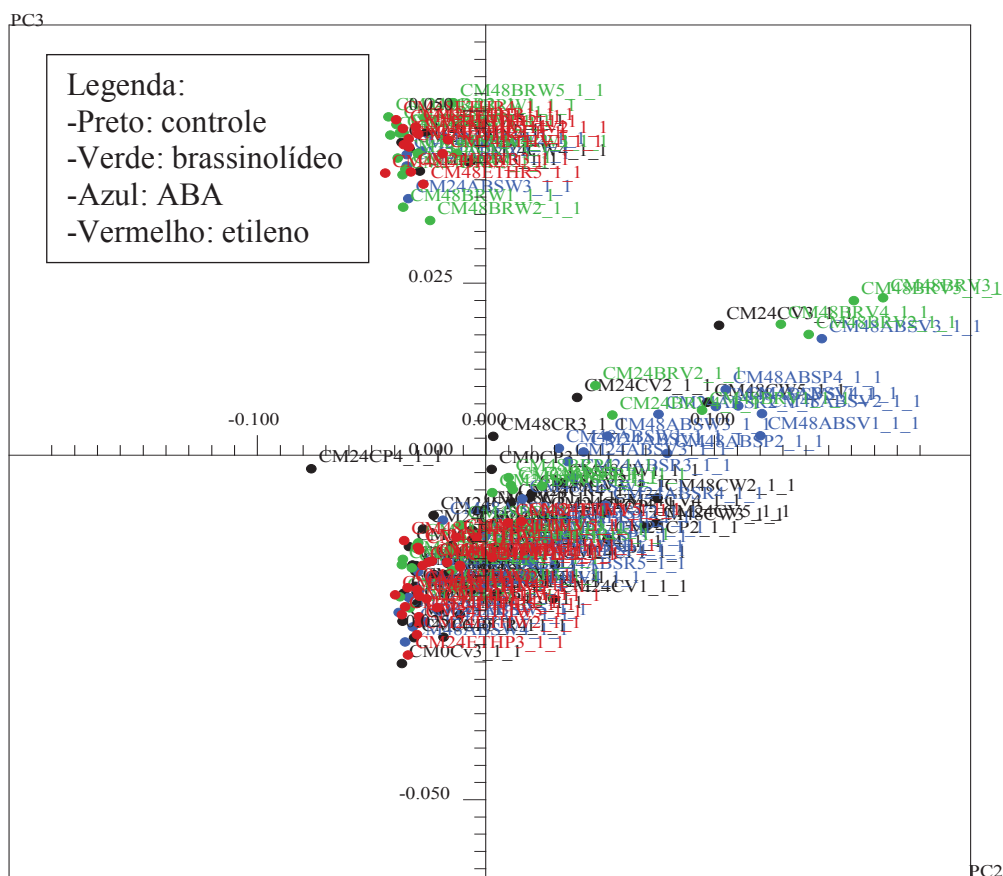


Figura 54: Gráficos de *scores* das combinações de PC2 x PC3.

As amostras foram analisadas separadamente de acordo com os estádios de maturação (verde, branco, rosa e vermelho; incluindo os tempos de 24 e 48 h).

Analisando-se somente as amostras do grupo controle foi observada a discriminação em dois grupos (Figura 55). O grupo que se distinguiu foi formado por quatro amostras no estágio branco após 24 h do início da contagem do tempo.

O gráfico de *scores* mostrou o agrupamento em PC3 (com variância explicada de 1,77%, Figura 56). Analisando o gráfico de *loadings* (Figura 57) observou-se que os sinais referentes às regiões de açúcares (4,02 ppm), frutose (4,13 ppm) e α -glicose (5,22 ppm) foram os responsáveis pela diferenciação das amostras.

O mesmo agrupamento foi obtido nas combinações PC2 (6,39%) x PC3(1,77%), enquanto que a combinação de PC1(87,33%) x PC2(6,39%) não apresentou agrupamento. Mesmo ocorrendo o agrupamento, não apresentou uma discriminação lógica, visto que não é composto pela quintuplicata.

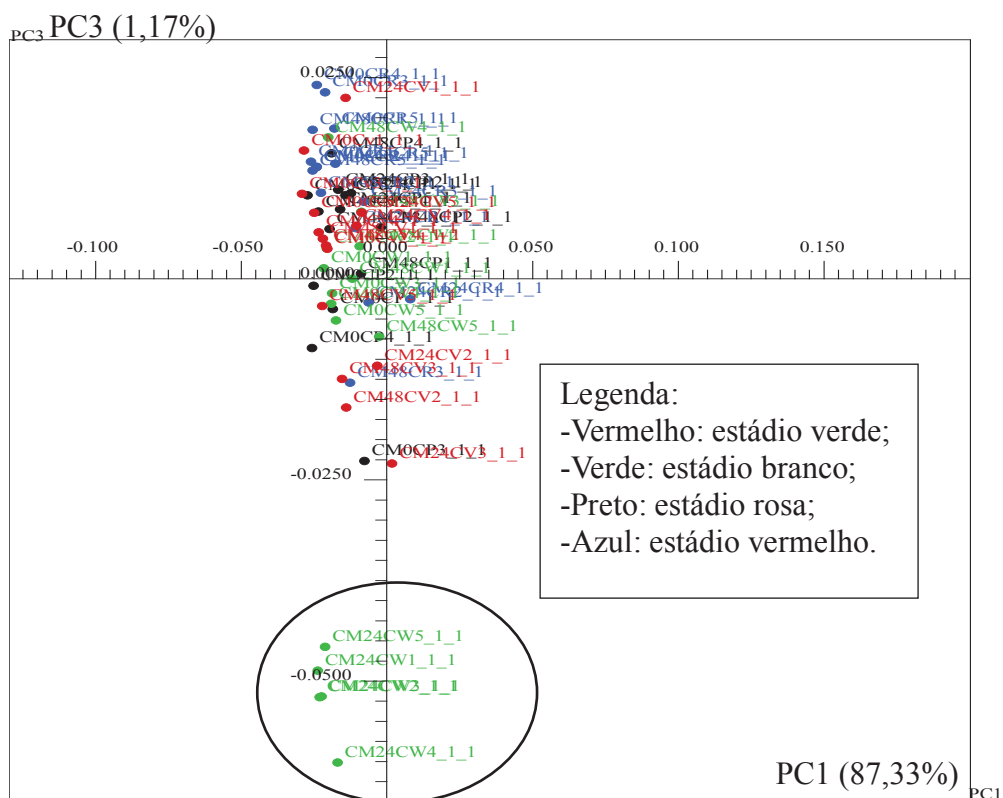


Figura 55: Gráfico de *scores* dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos das amostras controle, segundo o estágio de maturação (verde, branco, rosa e vermelho).

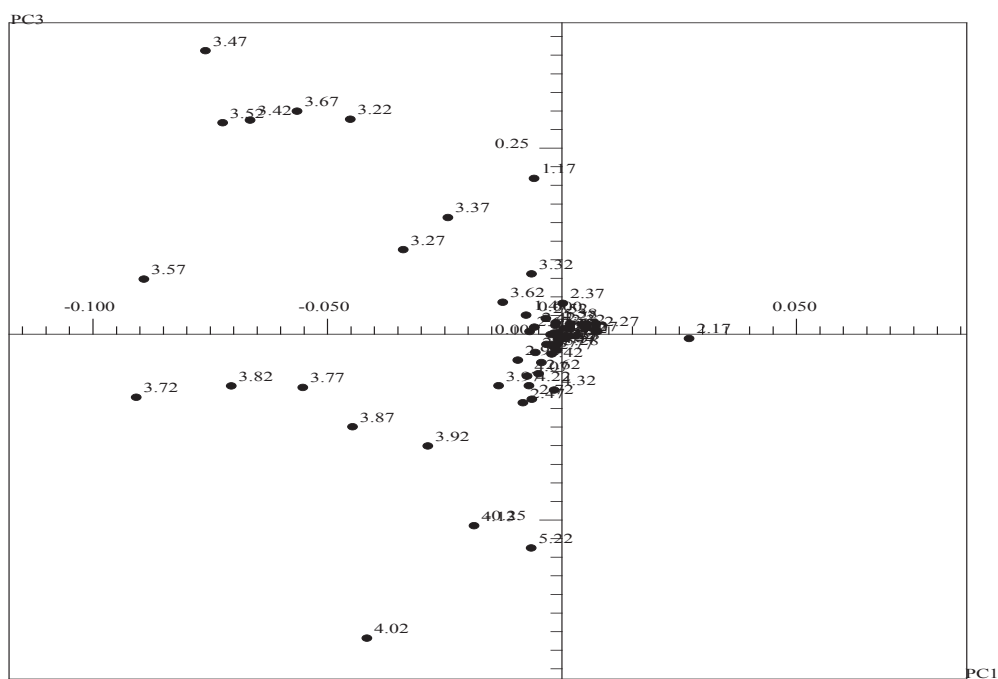


Figura 56: Gráfico de *loadings* dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos das amostras controle, segundo o estágio de maturação (verde, branco, rosa e vermelho).

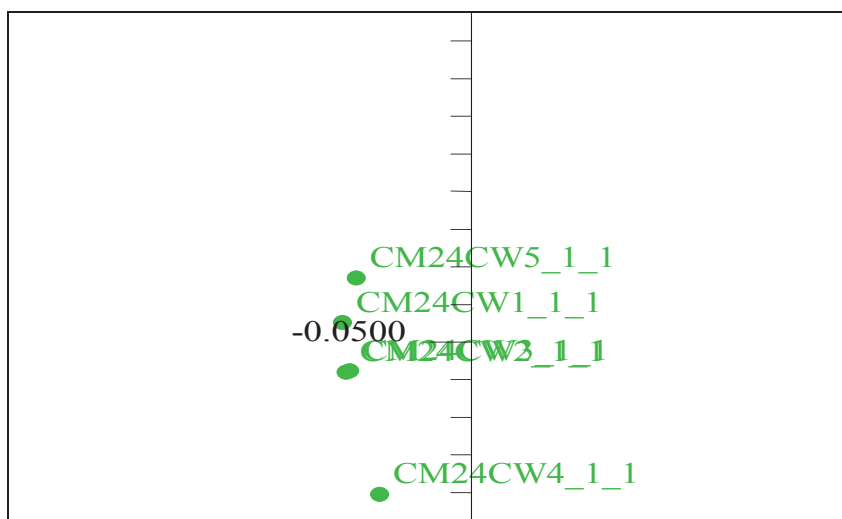


Figura 57: Expansão da região de agrupamento da combinação de PC1 x PC3.

Analisando-se as amostras tratadas com ABS foi observado dois agrupamentos em PC1 x PC3 (Figura 58). Entretanto, apenas as quintuplicatas das amostras de morango branco com 24 h de tratamento agruparam-se segundo PC3 positivo, outro agrupamento ocorreu segundo PC1 positivo, com as amostras no estágio verde do tempo 48h. PC1 explica uma variância de 65,09% e PC3 explica 8,63% de variância dos dados, sendo que esta diferenciação pode ser observada no gráfico de *loadings*, onde os *buckets* referente aos sinais de açúcares (4,02 ppm, açúcar; 4,13 ppm, frutose e 5,22 ppm, α -glicose) são responsáveis pelo agrupamento das amostras do estágio branco, enquanto amostras no estágio verde tem como responsável um *bucket* na região de 3,32 ppm (Figura 59). Quando comparada aos resultados das amostras de controle pôde-se observar o mesmo agrupamento das amostras de morango branco após 24 h em PC3 principalmente e com sinais de açúcares como responsáveis pela diferenciação, e diferente das amostras controle o grupo de amostras no estágio verde se diferenciou com sinal na região de 3,32 ppm.

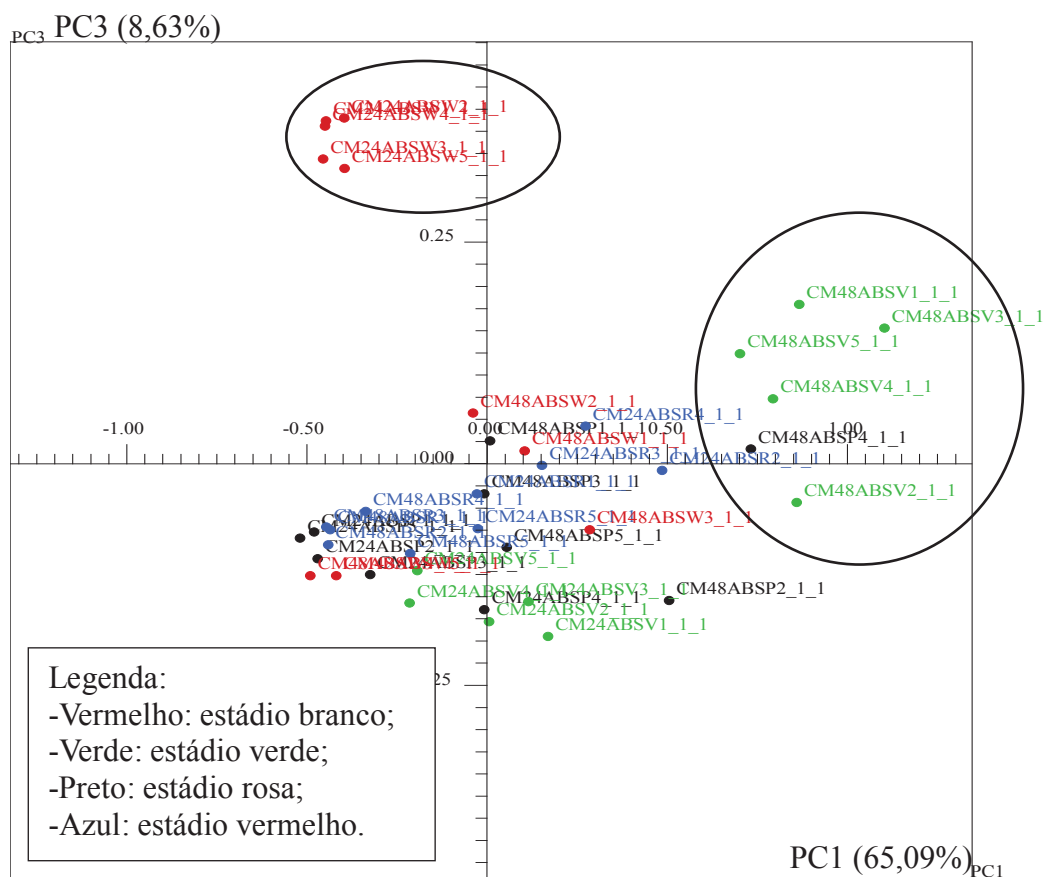


Figura 58: Gráfico de *scores* dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos das amostras tratadas com ácido abscísico (ABA), segundo os estádios de maturação.

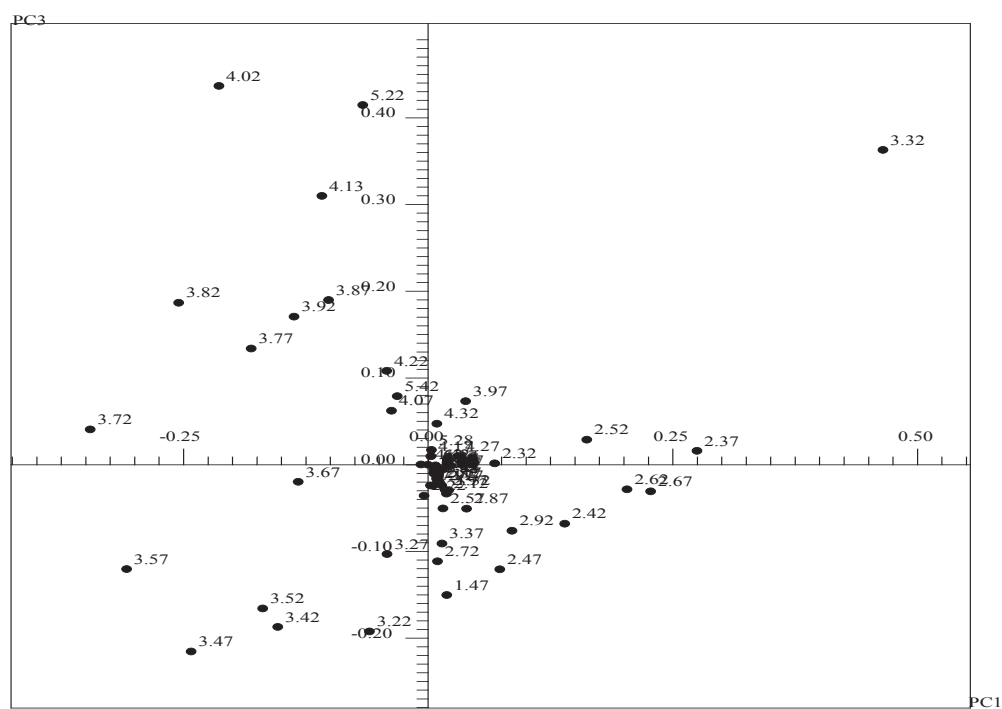


Figura 59: Gráfico de *loadings* dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos das amostras tratadas com ácido abscísico (ABA), segundo os estádios de maturação.

Analisando-se as amostras tratadas com etileno foi observada a discriminação em dois grupos em PC1 (Figura 60). Neste caso o melhor agrupamento ocorreu na combinação de PC1 x PC2, sendo que PC1 explica 60,12%; PC2 19,92%; PC3 7,94% e PC4 explica 4,72% da variância dos dados. O primeiro agrupamento abrangeu um grande grupo de amostras, que não diferencia estádios de maturação (Figura 61). O segundo agrupamento abrangeu duas amostras no estágio verde, após 24 h de tratamento e as quintuplicatas de amostras de morango vermelho após 24 e 48 h de tratamento. Desta forma, não se pôde observar uma tendência, o que indica que apenas possuem características semelhantes, porém não representam o grupo de amostras. Analisando-se o gráfico de *loadings* (Figura 62), observou-se que novamente os mesmos sinais de açúcares foram responsáveis pela discriminação das amostras.

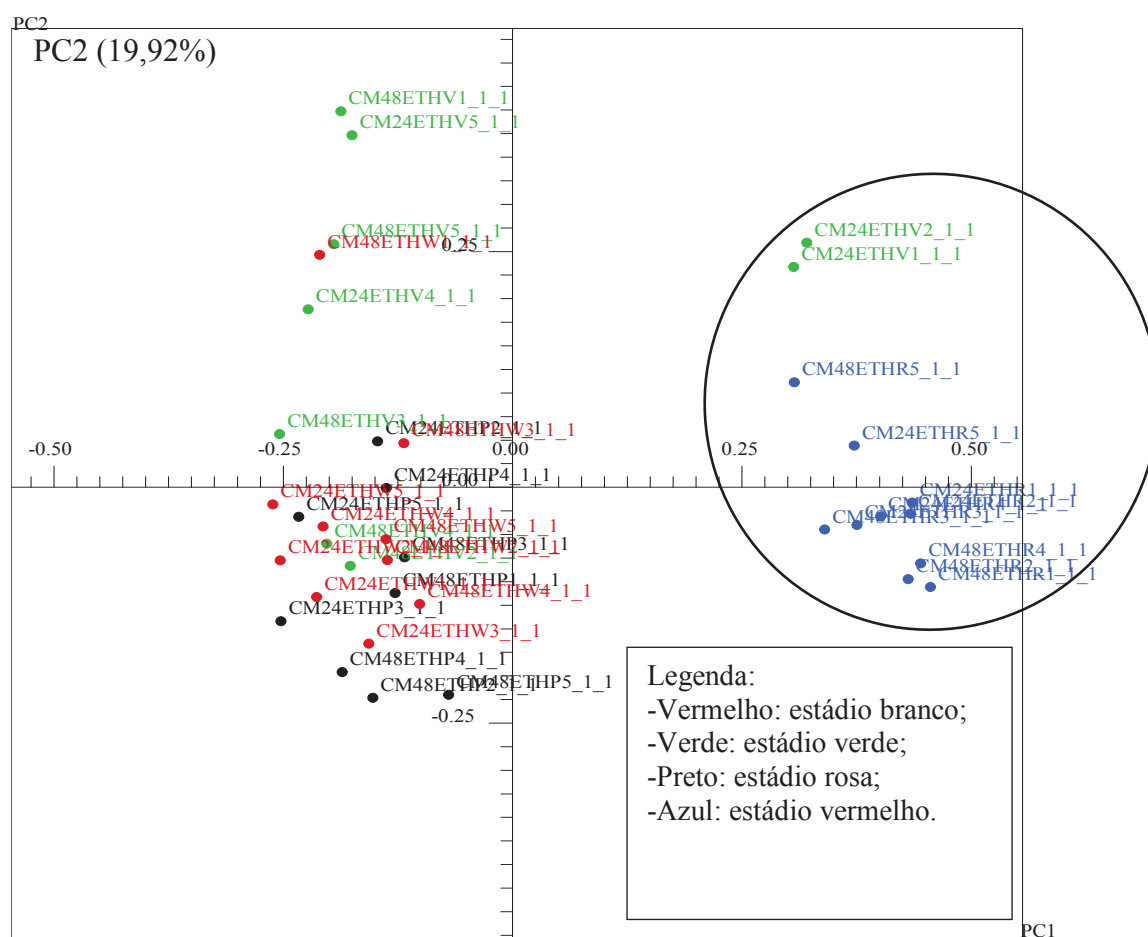


Figura 60: Gráfico de *scores* dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos das amostras tratadas com etileno (ETH), segundo o estágio de maturação.

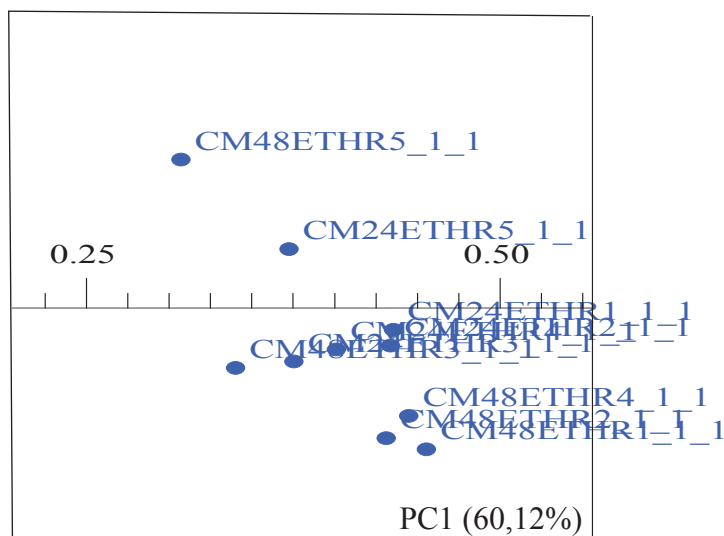


Figura 61: Expansão da região de agrupamento (PC1 positivo) das amostras tratadas com etileno.

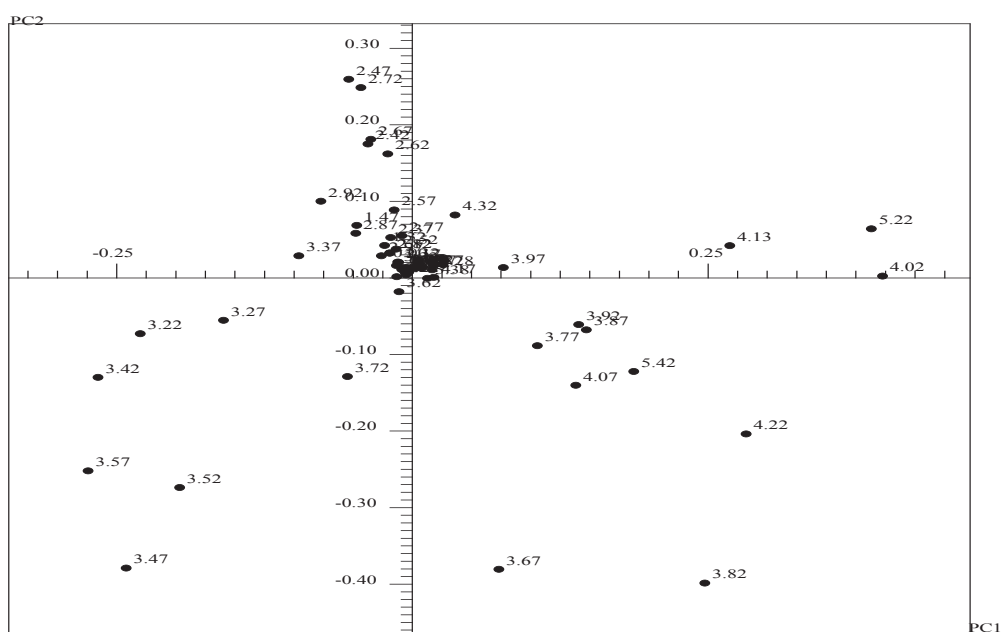


Figura 62: Gráfico de *loadings* dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos das amostras tratadas com etileno (ETH), segundo o estágio de maturação.

Comparando com os agrupamentos das amostras controle, amostras de etileno apresentaram os mesmos *buckets* responsáveis pelo agrupamento (amostras controle com agrupamentos segundo PC3, amostras tratadas com etileno agrupadas segundo PC1). Enquanto as amostras do grupo controle que foram agrupadas são do estágio branco, as amostras tratadas agrupadas foram principalmente no estágio vermelho. Porém, tal comportamento não pode ser atribuído ao tratamento, visto que amostras de

morango verde também foram agrupadas com morango vermelho, indicando assim que não há um comportamento característico.

Analisando as amostras tratadas com brassinolídeo, o gráfico de *scores* (Figura 63) apresentou três agrupamentos, entretanto, não apresentou uma tendência lógica nas amostras. Os agrupamentos ocorreram principalmente em PC1 x PC2, sendo que PC1 explica 68,07% da variância dos dados; PC2 explica 14,13%; PC3 8,94% e PC4 2,52% da variância dos dados. O primeiro grupo, formado em PC1 positivo abrangeu as quintuplicatas das amostras de morango verde após 24 e 48 h de tratamento.

O segundo agrupamento em PC2 positivo apresentou as quintuplicatas das amostras de morango rosa após 24 e 48 h de tratamento; as quintuplicatas das amostras de morango vermelho e ainda uma amostra de morango verde. No terceiro agrupamento ficaram reunidas as amostras de morango branco com 24 e 48 h de tratamento e amostras de morango vermelho com 48 h de tratamento (Figura 64).

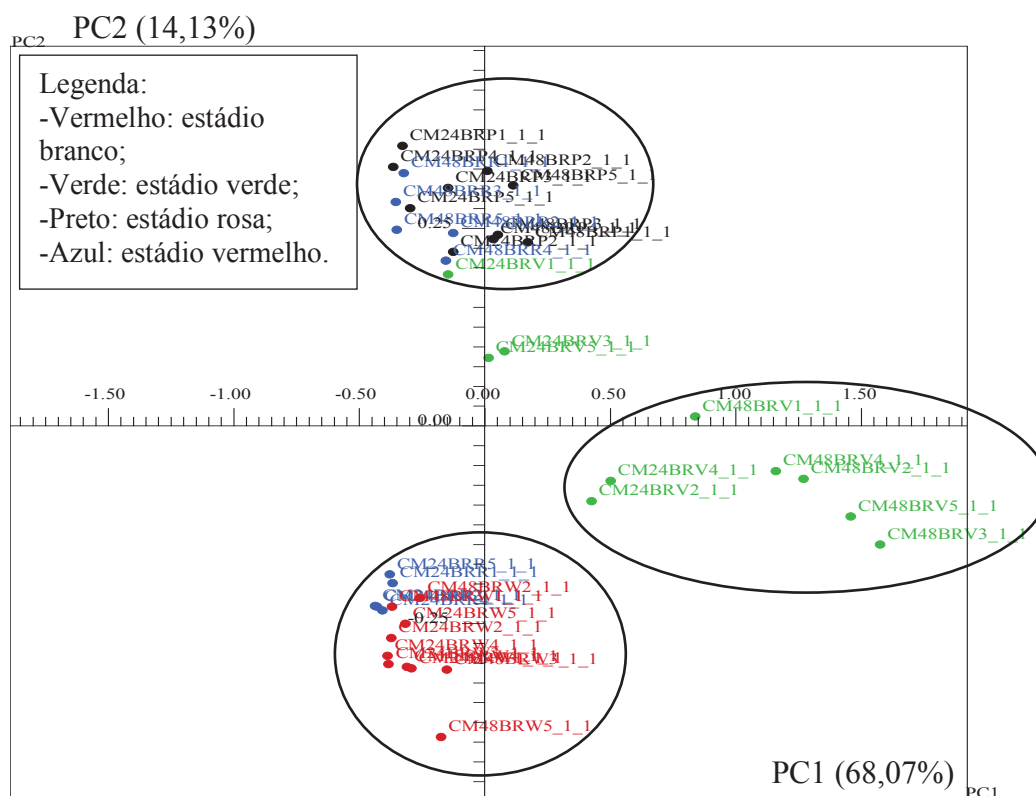


Figura 63: Gráfico de *scores* dos *buckets* obtidos dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos das amostras tratadas com brassinolídeo (BR), segundo o estágio de maturação.

Novamente não foi observada uma tendência lógica como, por exemplo, não foi observada a discriminação dos diferentes estádios de maturação da fruta.

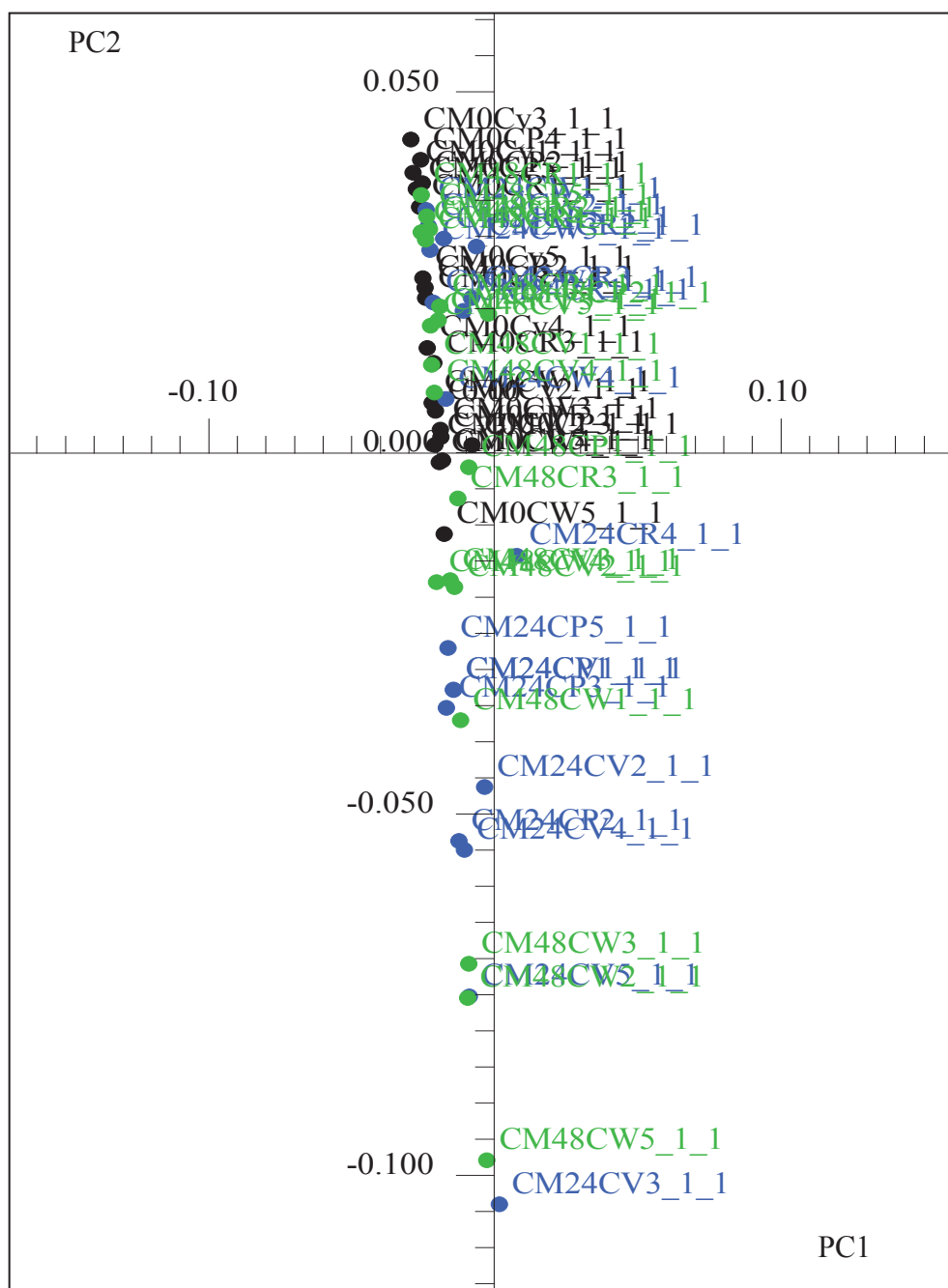


Figura 66: Gráfico de *scores* de amostras do grupo de controle, indicando tempos de tratamento 0h (preto); 24h (azul) e 48h (verde).

Figura 68: Gráfico de *scores* de amostras do grupo tratado com etileno, indicando tempos de tratamento 24h (preto) e 48h (azul).

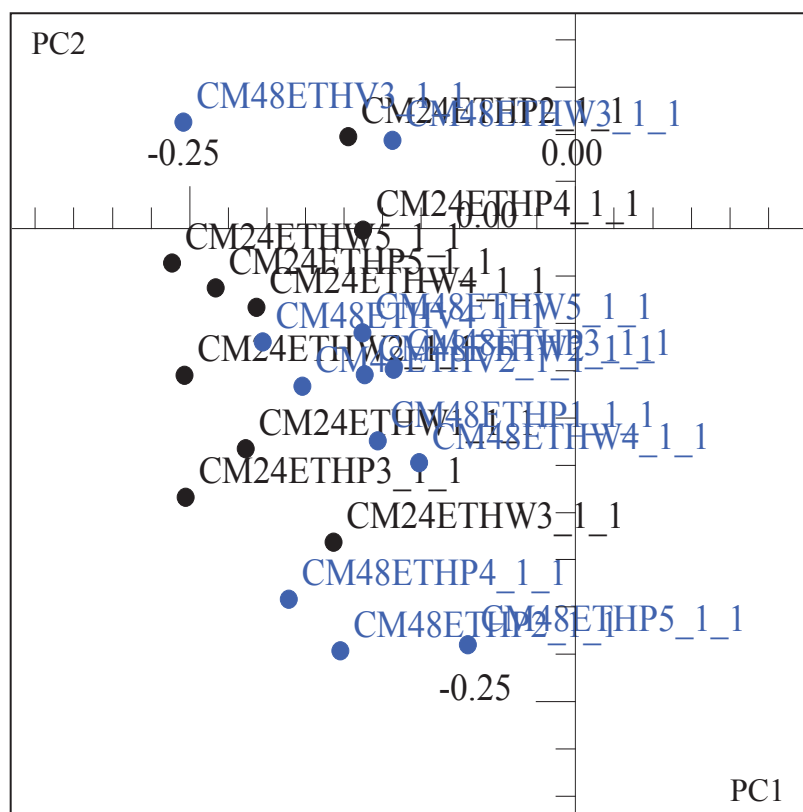


Figura 69: Ampliação do gráfico de *scores* das amostras tratadas com etileno na região de PC2.

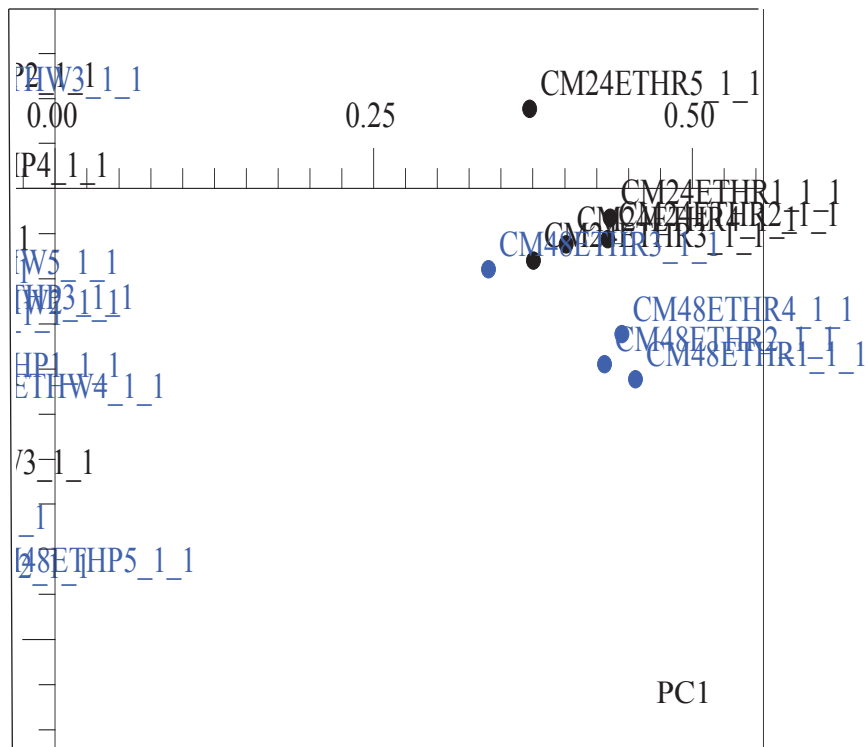


Figura 70: Ampliação do gráfico de *scores* das amostras tratadas com etileno na região de PC1 positivo.



Figura 71: Gráfico de *scores* de amostras do grupo tratado com ácido abscísico, indicando tempos de tratamento 24h (preto) e 48h (azul).

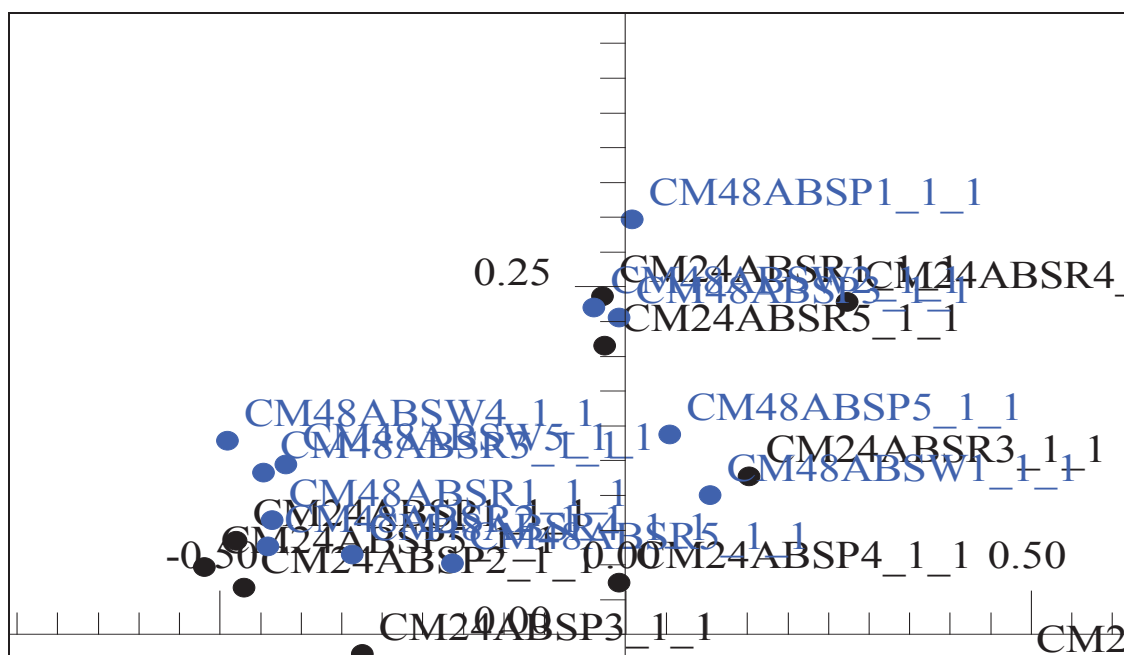


Figura 72: Ampliação do gráfico de *scores* das amostras tratadas com ácido abscísico na região de PC1.

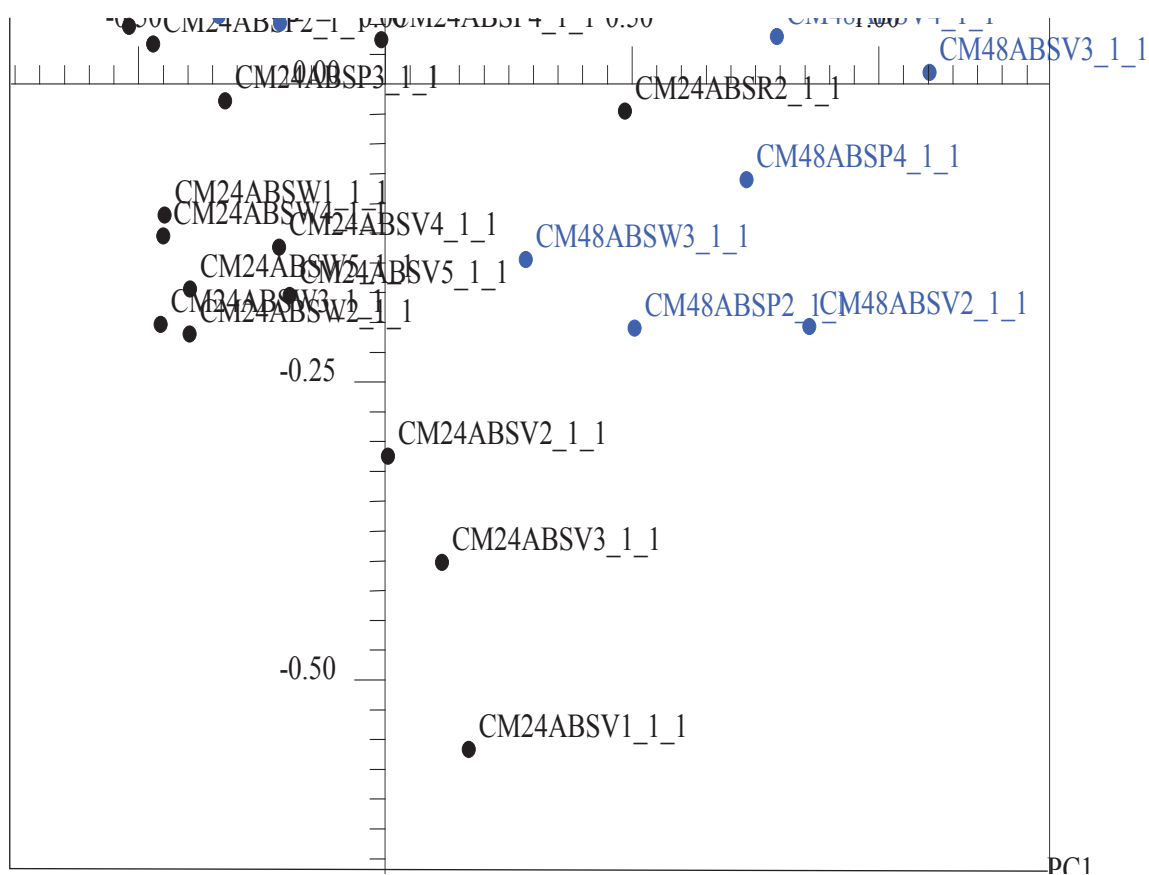


Figura 73: Ampliação do gráfico de *scores* das amostras tratadas com ácido abscísico na região de PC1.

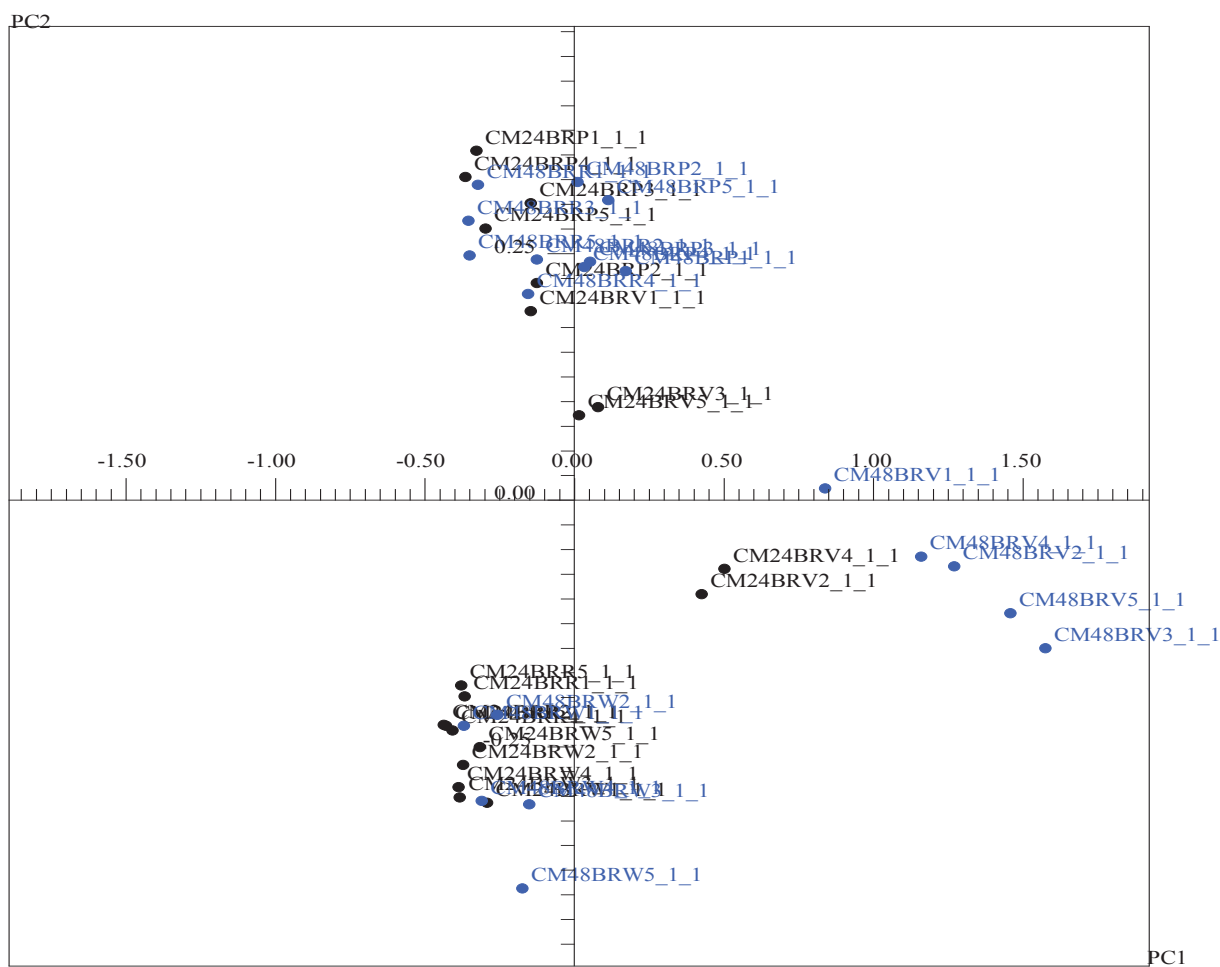


Figura 74: Gráfico de *scores* de amostras do grupo tratado com brassinolídeo, indicando tempos de tratamento 24h (preto) e 48h (azul).

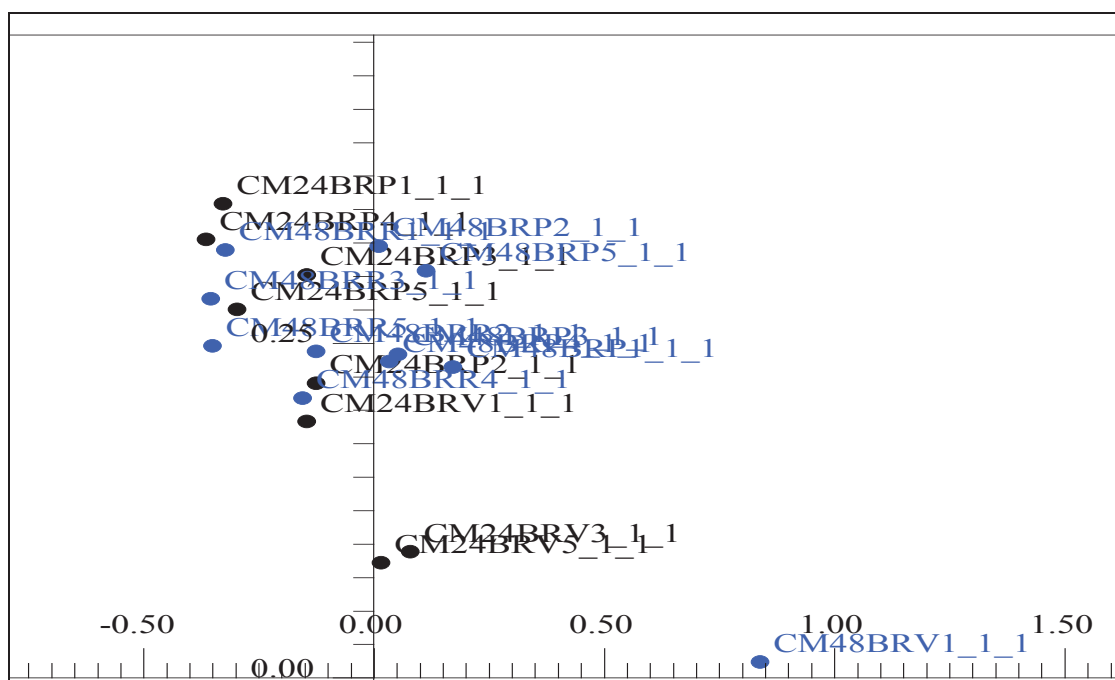


Figura 75: Ampliação do gráfico de *scores* das amostras tratadas com brassinolídeo na região de PC2 positivo.

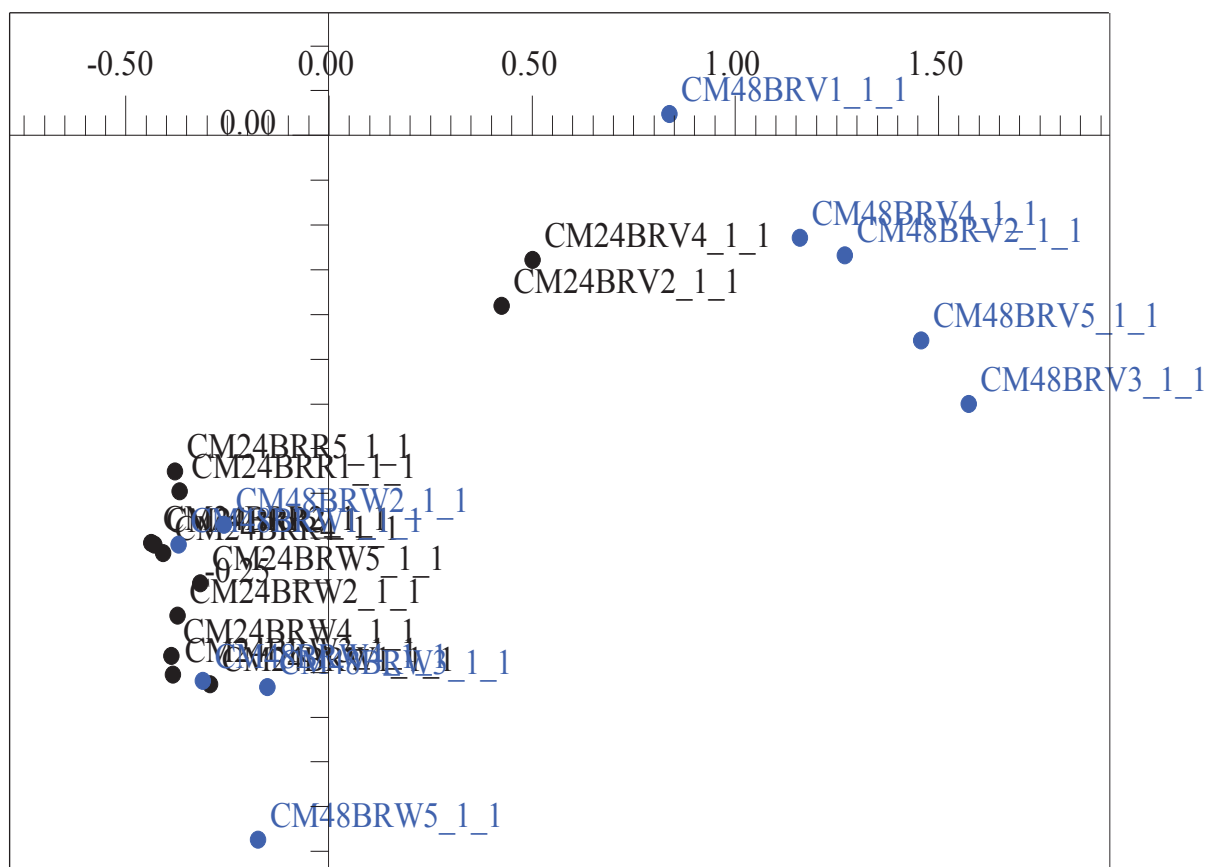


Figura 76: Ampliação do gráfico de *scores* das amostras tratadas com brassinolídeo na região de PC2 negativo.

5 Conclusão

Através da otimização dos parâmetros de aquisição foi obtida a melhor combinação para as amostras de morango, sendo esta: sequência de pulsos ZGPR; número de promediações de 1024; velocidade de giro de 5000 Hz; temperatura de 283 K; RG de 10,1; rotor de 50 μ L e utilizado tampão de fosfato com pH 6,7. Esta combinação de parâmetros se mostrou eficiente para a saturação, resolução e intensidade de sinais minoritários. Durante tempo de aquisição foram observadas alterações degradativas de açúcares principalmente devido a exposição de compostos a enzimas e oxigênio, desta maneira as amostras foram trituradas sem a casca, preparadas e em seguida adquiridos os espectros de RMN HR-MAS de ^1H .

Após a otimização de parâmetros de aquisição; preparo de amostras e estudo de estabilidade foram obtidos espectros de RMN HR-MAS de ^1H qualitativos e quantitativos. Nestes espectros foram identificados 14 compostos comumente encontrados em frutas (isoleucina, valina, treonina, alanina, glutamina, ácido málico, cítrico e fumárico, asparagina, α e β -glicose, sacarose, frutose, tirosina e triptofano).

Através das análises físico-químicas foram observados comportamento semelhante para amostras tratadas e controle. Portanto não foi possível atribuir nenhuma variação ao tratamento aplicado a amostra. Na análise de componentes principais foram avaliados todos os tratamentos na tentativa de observar diferenças entre os conjuntos de amostras, entretanto apenas as combinações com PC3 apresentaram pequenos agrupamentos, devido principalmente a *buckets* na região de açúcares, fato que também foi observado durante os testes de preparo de amostra, no qual observou-se degradação de açúcares durante tempo de aquisição. O mesmo fato foi identificado nas combinações entre estádios e em relação ao tempo de tratamentos. Desta maneira não foi possível atribuir variações de comportamento ao tratamento aplicado a amostra.

Referências

- ABDI, N.; MCGLASSON, W. B.; HOLFORD, P.; WILLIAMS, M.; MIZRAHI, Y. Responses of climacteric and suppressed climacteric plums to treatment with propylene and 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology*, vol. 14, pág. 29-39, 1998.
- AIZAT, W. M.; DIAS, D. A.; STANGOULIS, J. C. R.; ABLE, J. A.; ROESSNER, U.; ABLE, A. J. Metabolomics of capsicum ripening reveals modification of the ethylene related-pathway and carbon metabolism. *Postharvest Biology and Technology*, vol. 89, pág. 19-31, 2014.
- ALI, K.; MALTESE, F.; FORTES, A. M.; PAIS, M. S.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Monitoring biochemical changes during grape berry development in Portuguese cultivars by NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, vol. 124, pág. 1760-1769, 2011. Não esta no texto
- ALMEIDA, L. H. de. **Qualidade de Morango e Framboesa. Efeito de diferentes práticas culturais, datas de colheita e estabilidade durante conservação sob congelamento.** Lisboa, 2012. 95f. Dissertação de mestrado em Engenharia Alimentar, Universidade Técnica de Lisboa, 2012.
- ANDO, I.; HIROSE, T.; NEMOTO, T.; TOTSUNE, K.; IMAI, Y.; TAKEUCHI, K.; FUJIWARA, M. Quantification of molecules in ¹H-NMR metabolomics with formate as a concentration standart. *Journal Toxicology Science*, v. 35, pág. 253-256, 2010.
- ANDRADE, P. F. S. Análise da conjuntura agropecuária safra 2010/11, fruticultura, Secretaria da Agricultura e do Abastecimento, Departamento de Economia Rural. Disponível em:
http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2010_11.pdf. Acesso em 14 de novembro, 2011.
- ANTUNES, O. T.; CALVETE, E. O.; ROCHA, H. C. Floração, frutificação e maturação de frutos de morangueiro cultivados em ambiente protegido. *Horticultura Brasileira*, vol. 24, n° 4, pág. 426-430, 2006.

- ANTUNES, L. E. C.; REISSER JÚNIOR, C. Fragole, i produttori brasiliani mirano all'esportazione in Europa. *Frutticoltura* (Bologna), vol. 69, pág. 60-65, 2007.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Method of Analysis. 18° ed. Washington, DC, USA, 2002.
- ARGENTA, L. C.; MONDARGO, M. Maturação na colheita e qualidade de maçãs' gala' após a armazenagem. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, vol. 6, pág.135-140, 1994.
- BARISON, A. **Emprego da RMN HR-MAS e análise quimiométrica no reconhecimento e avaliação de soja (*Glycine Max*) geneticamente modificada.** 268f. Tese de doutorado em química orgânica, Universidade Federal de São Carlos, 2005.
- BOMBARELY, A.; MERCHANTE, C.; CSUKASI, F.; CRUZ-RUZ, E.; CABALLERO, J. L.; MEDINA-ESCOBAR, N.; BLANCO-POTALES, R.; BOTELLA, M. A.; MUNHOZ-BLANCO, J.; SÁNCHESES-SEVILLA, J.; VALPUESTA, V. Generation and analysis of ESTs from strawberry (*Fragaria*×*ananassa*) fruits and evaluation of their utility in genetic and molecular studies. *BMC Genomics*, vol. 11,pág. 1-17, 2010.
- BROBERG A.; KENNE L. Use of high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy for *in situ* studies of low-molecular-mass compounds in red algae. *Analytical Biochemistry*, vol. 284, pág. 367-374, 2000.
- BROBERG, A.; KENNE, L.; PEDERSÉN, M. *In-situ* identification of major metabolites in the red alga *Gracilariopsis Lemaneiformis* using hight-resulition magic angle spinning nuclear magnetic resonance sprectroscopy. *Planta*, vol. 206, pág. 300-307, 1998.
- CARDOSO, L. M.; DEUS, V. A.; SILVA, E. B.; ANDRADE JUNIOR, V. C.; DESSIMONI-PINTO, N. A. V. Qualidade pós-colheita de morangos cv. 'diamante' tratados com cloreto de cálcio associado a hipoclorito de sódio. *Alimentos e Nutrição*, vol. 23, pág. 583-588, 2012.
- CASTRO, R. L. de. **Diversidade genética, adaptabilidade e estabilidade do morangueiro (*fragaria x ananassa* Duch.) e cultivo orgânico.** Viçosa, 2002. 159f. Tese de doutorado em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, 2002.

- CAVALINI, F. C. **Fisiologia do amadurecimento, senescência e comportamento respiratório de goiabas ‘Kumagai’ e ‘Pedro Sato’**. Piracicaba, 2008. 91f. Tese, Doutorado em Ciências, Universidade de São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2008.
- CHAI, Y.- M.; ZHANG, Q.; TIAN, L.; LI, C-L; XING, Y.; QIN, L.; SHEN, Y-Y. Brassinosteroid is involved in strawberry fruit ripening. *Plant Growth Regulation*, vol. 69, pág. 63-69, 2013.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutas e hortaliças. 2º edição, Editora: Universidade Federal de Lavras, 2005.
- CHO, I. H.; KIM, Y. S.; CHOI, H. K. Metabolomic discrimination of different grades of pine-mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.) using ^1H NMR spectrometry and multivariate data analysis. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 43, pág. 900-904, 2007.
- CORDENUNSI, B. R.; GENOVESE, M. I.; NASCIMENTO, J. R. O.; HASSIMOTO, N. M. A.; SANTOS, R. J.; LAJOLO, F. M. Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. *Food Chemistry*, vol. 91, pág. 113-121, 2005.
- CLARIDGE, T. D. W. High-resolution NMR Techines in organic chemistry. Editora Pergamon. Amsterdam, 1999.
- CSUKASI, F.; OSÓRIO, S.; GUTIERREZ, J. R.; KITAMURA, J.; GIAVALISCO, P.; NAKAJIMA, M.; FERNIE, A.R.; RATHJEN, J. P.; BOTELLA, M. A.; VALPUESTA, V.; MEDINA-ESCOBAR, N. Gibberellin biosynthesis and signalling during development of the strawberry receptacle. *New Phytologist*, vol. 191, pág. 376-390, 2011.
- DAIOLO, C. **Aplicação de técnicas espectrométricas, cromatográficas e quimiométricas na avaliação de autenticidade de plantas usadas como fitoterápicos**. 140f. Tese de doutorado em Ciências, Universidade Federal de São Carlos, 2006.
- DEL CAMPO, G., BERREGI, I., CARACENA, R.; SANTOS, J. I. Quantitative analysis of malic and citric acids in fruit juices using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, vol. 556, pág. 462-468, 2006.

- EADS, T. M.; BRYANT, R. G. High-resolution proton NMR spectroscopy of milk, orange juice and apple juice with efficient suppression of the water peak. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 34, pág. 834-837, 1986.
- FACHINELLO, J. C.; PASA, M. DA S.; SCHMTIZ, J. D.; BETEMPS, D. L. Situação E Perspectivas Da Fruticultura De Clima Temperado No Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, vol. Especial, pág. 109-120, 2011.
- FANG, X.; QIU, F.; YAN, B.; WANG, H.; MORT, A. J.; STARK, R.E. NMR studies of molecular structure in fruit cuticle polyesters. *Phytochemistry*, vol. 57, pág. 1035-1042, 2001.
- FONSECA, A. P. da, **Estabilidade genética de plantas de diferentes genótipos de morango (Fragaria x ananassaDuch) micropropagadas submetidas a diferentes números de subcultivos**. Rio de Janeiro, 2010. 80f. Tese de doutorado em fisiologia de produção, Universidade Federal Rural Do Rio De Janeiro, 2010.
- FOTAKIS, C.; KOKKOTOU, K.; ZOUMPOULAKIS, P.; ZERVOU, M. NMR metabolite fingerprinting in grape derived products: An overview. *Food Research International*, vol. 54, pág. 1184-1194, 2013.
- GARROD, S.; HOLMES, E.; HUNPFER, E. HR-MAS: a new tool for semisolid samples. *Bruker Report*, número 146, pág. 16-18, 1998.
- GIL, A. M.; DUARTE, I. F.; DELGADILLO, I.; COLQUHOUN, I. J.; CASUSCELLI, F.; HUMPFER, E.; SPRAUL, M. Study of the Compositional Changes of Mango during Ripening by Use of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal Agricultural Food Chemistry*, vol. 48, pág. 1524-1536, 2000.
- HAFFNER, K.; ROSENFELD, H. J.; SKREDE, G. b; WANG, L. Quality of red raspberry *Rubus idaeus* L. cultivars after storage in controlled and normal atmospheres. *Postharvest Biology and Technology*, vol. 24, pág. 279-289, 2002.
- HÄKKINEN, S. H; TÖRRÖNEN, A. R. Content of flavonols and selected phenolic acids in stramberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*, vol. 33, pág. 517-524, 2000.
- HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; ALMENAR, E.; OCIO, M. J.; GAVARA, R. Effect of calcium dips and chitosan coatings on postharvest life of strawberries (*Fragaria x ananassa*). *Postharvest Biology and Technology*, vol. 39, pág. 247-253, 2006.

- HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonoids and flavones: the Brazilian sources and factors that influence the composition in food. *Alimentaria Nutricional*, Araraquara, vol.19, pág. 97-108, 2008.
- HYTONEN, T.; ELOMAA, P.; MORITZ, T.; JUNTILLA, O. Gibberellin mediates daylength-controlled differentiation of vegetative meristems in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch). *BMC Plant Biology*, vol. 9, pág. 1-12, 2009.
- IADEROZA, M.; BALDINI, V. L. S.; DRAETTA, I. dos S. Anthocyanins from fruits of açaí (*Euterpe oleracea*, Mart) and juçara (*Euterpe edulis* Mart). *Tropical Science*, vol. 32, pág. 41-46, 1992.
- IGLESIAS, M. J.; LÓPEZ, J. G.; LUJÁN, J. F. C.; ORTIZ, F. L.; PEREZNIETO, H. B.; TORESANO, F.; CAMACHO, F. Effect of genetic and phenotypic factors on the composition of commercial marmande type tomatoes studied through HRMAS NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, vol. 142, pág. 1–11, 2014.
- KERBAUY, G. B. Fisiologia Vegetal. 2ª ed., Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 2008.
- KJELDAHL, K.; BRO, R. Some common misunderstandings in chemometrics. *Journal of Chemometrics*, vol. 24, pág.558-564, 2010.
- KUMAR, N.; BANSAL, A.; SARMA, G. S.; RAWAL, R. K. Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. *Talanta*, vol. 123, pág. 116-199, 2014.
- LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 39, n. 3, jul/set, pág. 227-242, 2003.
- LI, C.; JIA, H.; CHAI, Y.; SHEN, Y. Absciscic acid perception and signaling transduction in strawberry: A model for non-climacteric fruit ripening. *Plant Signaling & Behavior*, vol. 6, pág. 1950-1953, 2011.
- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: Composição e estabilidade. *Boletim CEPPA*, vol. 24, pág. 59-82, 2006.
- MCKENZIE, J. S.; DONARSKI, J. A.; WILSON, J. C.; CHARLTON, A. J. Analysis of complex mixtures using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometrics. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, vol. 59, pág. 336-359, 2011.

- MENEZES, E. M. S. **Efeito da alta pressão hidrostática em polpa de açaí pré-congelada (*Euterpe oleracea*, Mart.)**. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2005.
- MENZ, G.; VRIESEKOOOP, F. Physical and Chemical Changes during the Maturation of Gordal Sevillana Olives (*Olea europaea* L., cv. Gordal Sevillana). *Journal Agricultural Food Chemistry*, vol. 58, pág. 4934-4938, 2010.
- MUCCI, A.; PARENTI, F.; RIGUI, V.; SCHENETTI, L. Citron and lemon under the lens of HR-MAS spetrocopy. *Food Chemistry*, vol. 141, pág. 3167-3176, 2013.
- OLIVEIRA, R. P. DE; SCIVITTARO, W. B.; FINKENAUER, D. Produção de morangueiro da Cv. Camiño Real em sistema de túnel. *Brasileira de Fruticultura*, vol. 30, n. 3, pág. 681-684, 2008.
- PAN, Q.-H.; LI, M.-J.; PENG, C.-C.; ZHANG, N.; ZOU, X.; WANG, X.-F.; ZHANG, D.-P. Absciscic acid activates acid invertases in developing grape berry. *Physiologia Plantarum*, vol. 125, pág. 188-199, 2005.
- PARIKH, H. R.; NAIR, G. M.; MODI, V. V. Some Structural Changes During Ripening of Mangoes (*Mangifera indica* var. Alphonso) by Absciscic Acid Treatment. *Annals of Botany*, vol. 65, pág. 121-127, 1990.
- PAYASI, A.; SANWAL, G. G. Ripening of Climacteric Fruits and Their Control. *Journal of Food Biochemistry*, vol. 34, pág. 679-710, 2010.
- PEINADO, I; ROSA, E.; HERIDIA, A.; ESCRICHE, I. Influence of processing on the volatile profile of stramberry spreads made with isomaltulose. *Food Chemistry*, vol. 138, pág. 621-629, 2013.
- PERKINS-VEAZIE, P. Growth and Ripening of Strawberry Fruit. *Horticultural Reviews*, pág. 267-297, 2010.
- PÉREZ, E. M. S.; LÓPEZ, J. G.; IGLESIAS M. J.; ORTIZ, F. L.; TORESANO, F.; CAMACHO, F. HRMAS-nuclear magnetic resonance spectroscopy characterization of tomato “flavor varieties” from Almería (Spain). *Food Research International*, vol. 44, pág. 3212-3221, 2011.
- PÉREZ, E. M. S.; IGLESIAS, M. J.; ORTIZ, F. L.; PÉREZ, I. S.; GALERA, M. M. Study of the suitability of HR-MAS NMR for metabolic profiling of tomatoes:

- Application to tissue differentiation and fruit ripening. *Food Chemistry*, vol. 122, pág. 877-887, 2010.
- PERETTO, G.; DUB, W-X; AVENA-BUSTILLOSB, R. J.; SARREAL, S. B. L.; HUA, S. S. T.; SAMBO, P.; MCHUGH, T. H. Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamate antimicrobial vapors released from edible films. *Postharvest Biology and Technology*, vol. 89, pág. 11-18, 2014.
- PINELI, L. L. O.; R. T.; MORETTI C. L.; CAMPOS A. B.; ROCHA, T. O.; BRASILEIRO, A. V.; GLEYCY, G.; SANTANA, M. A.; SANTOS, M. S. DOS Caracterização física, química e sensorial de morangos ‘Osogrande’ e ‘CamiñoReal’ armazenados a 5 e a 15°C. *Horticultura Brasileira*, vol. 26, pág. 5497-5501, 2008.
- PINELI, L. L. O. **Qualidade e potencial antioxidante in vitro de morangos in natura e submetidos a processamentos.** Brasília, 2009. 222f. Tese de Doutorado em Ciência da Saúde, Universidade de Brasília, 2009.
- PINHEIRO, J. M. S. **Tecnologia de pós-colheita para conservação de bananas de cultivar tropical.** Montes Claros, 2009. 59f. Dissertação de mestrado em Produção Vegetal, Universidade Estadual de Montes Claros, 2009.
- PRIMO, D. M. B. **Fisiologia da maturação e conservação Pós-colheita de frutos de palma forrageira.** João Pessoa, 2008. 136f. Dissertação de mestrado em Agrônômia, Universidade Federal da Paraíba, 2008.
- PRUZINSKA, A; TANNER, G.; ANDERS, I.; ROCA, M.; HORTENSTEIRNER, S. Chlorophyll breakdown: Pheophorbide a oxygenase is a rieke-type iron- sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene. *Plant Biology*, vol. 100, pág. 15259-15264, 2003.
- RITOTA, M; CASCIANI, L; FAILLA, S; VALENTINI, M. HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis meat characterization. *Meat Science*, vol. 4, pág. 754-761, 2012.
- RITOTA, M.; MARINI, F.; SEQUI, P.; VALENTINI, M. Metabolomic Characterization of Italian Sweet Pepper (*Capsicum annum* L.) by Means of HRMAS-NMR Spectroscopy and Multivariate Analysis Agric. *Food Chemistry*, vol. 58, pág. 9675-9684, 2010.

- SACCO, A.; BOLSI, I. N.; MASSINI, R.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E.; GHELLI, S. Preliminary investigation on the characterization of Durum Wheat Flours Coming from some areas of south Italy by means of ^1H High-Resolution Magic Angle spinning nuclear magnetic resonance. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 46, pág. 4242-4249, 1998.
- SANTOS, A.D.C.; FONSECA, F. A.; LIÃO, L. M.; ALCANTARA, G. B.; BARISON, A. High resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance in foodstuff analysis. *Trends in analytical chemistry*, vol. 73, pág. 10-18, 2015
- SAVORANI, F.; PICONE, G.; BADIANI, A.; FAGIOLI, P.; CAPOZZI, F.; ENGELSEN, S. B. Metabolic profiling and aquaculture differentiation of gilthead sea bream by ^1H NMR metabonomics. *Food Chemistry*, vol. 120, pág. 907-914, 2010.
- SKUPIEŃ, K.; OSZMIANŃSKI, J. Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in northwest Poland. *European Food Research and Technology*, vol. 219, pág. 66-70, 2004.
- SOLINAS, A.; CHESSA, M.; CULLEDU, N.; PERCU, M. C.; VIRGILIO, G.; ARCADU, F.; DEPLANO, A.; COSSU, S.; SCANU, D.; MIGALEDDU, V. High resolution – magic angle spinning (HR-MAS) NMR-based metabolic fingerprint of early and recurrent hepatocellular carcinoma. *Metabolomics*, vol. 10, pág. 616-626, 2014.
- SPRAUL, M.; SCHÜTZ, B.; RINKE, P.; KOSWIG, S.; HUMPFER, E.; SCHAFER, H.; MORTTER, M.; FANG, MARX, U. C.; MINOJA, A. NMR-Based Multi Parametric Quality Control of Fruit Juices: SGF Profiling. *Nutrients*, vol. 1, pág. 148-155, 2009.
- STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W. do; HECKTHEUER, L. H. H. The Chlorophylls. *Ciência Rural*, vol. 35, pág. 748-755, 2005.
- SUN, J.-H.; LUOM, J.-J.; TIAN, L.; LI, C.-L.; XING, Y.; SHEN, Y.-Y New evidence for the role of ethylene in strawberry fruit ripening. *Journal Plant Growth Regulation*, vol. 32, pág. 461–470, 2013.
- SYMONS, G. M.; CHUA, Y.-J.; ROSS, J. J.; QUITTENDEN, L. J.; DAVIES, N. W.; REID, J. B. Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *Journal of Experimental Botany*, vol. 63, pág. 1-10, 2012.

- TRAINOTTI, L.; PAVANELLO, A.; CASADORO, G. Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries: does such an increment imply a role for ethylene in the ripening of these non-climacteric fruits? *Journal of Experimental Botany*, vol. 56, pág. 2037-2046, 2005.
- VERMATHEN, M.; MARZORATI, M.; BAUMGARTNER, D.; GOOD, C.; VERMATHEN, P. Investigation of Different Apple Cultivars by High Resolution Magic Angle Spinning NMR. A Feasibility Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, pág. 12784-12793, 2011.
- VICENTINI, V. B. **Tecnologias alternativas com potencial de ação sobre ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch no morangueiro *fragaria x ananassa* Duch.** Alegre, 2010. 93f. Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, 2010.
- VILLARREAL, N. M.; BUSTAMANTE, C. A.; CIVELLO, P. M.; MARTINEZ, G. A. Effect of ethylene and 1-MCP treatments on strawberry fruit ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 90, pág. 683-689, 2010.